

**Milde C-Acylierungen zur Synthese von bis- und triselektrophilen
Verbindungen sowie deren Umwandlung zu weiteren biologisch
relevanten Verbindungen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. Nat.)

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

ADEEB ELDAHSHAN
Aus Palästina (Gaza City)

November 2008

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Jörg Rademann

in der Zeit von Dezember 2004 bis November 2008 am Institut für Chemie und Biochemie-
Organische Chemie- des Fachbereiches Biologie, Chemie und Pharmazie der Freien Universität
Berlin und am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) durchgeführt.

Tag der mündlichen Prüfung 18.12.2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Rademann
2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Bienert

Herrn Prof. Dr. Jörg Rademann danke ich sehr herzlich für seine intensive Förderung, die Freiheit in der Bearbeitung des gestellten Themas und sein mir entgegengebrachtes Vertrauen.

Mein Dank gilt...

Dr. Jörg Bauer für seine freundliche Unterstützung für viele Diskussionen über die Festphasenchemie und Analytik und seine gute Freundschaft.

Dr. Samuel Beligny und Dr. Boo Geun Kim für ihre hilfreichen Diskussionen über Probleme in der organischen Synthese.

Andre Horatscheck für die Durchführung der HRMS Analysen.

Katharina Koschek für ihre sehr gute und genaue Korrektur einiger Teile dieser Arbeit.

Dr. Luidmilla Perepellitchenko für die sehr gute Zusammenarbeit und die Chemikalienbestellung. Ludmila; besten Dank für deine Süßigkeiten; du bist für meine Zunahme verantwortlich.

Sina Meyer für die Lösung aller Computerprobleme und ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Stefanie Grosskopf für die sehr gute Zusammenarbeit und ständige Hilfsbereitschaft.

Richard Raz für die Korrektur meiner Publikation und der Abstracts; danke für deine Mühe.

Dr. Jens von Kries für die hilfreiche Einführung in die Screening Unit.

Christoph Erdmann für die gute Zusammenarbeit über Zytotoxizitätsuntersuchungen der Sphingosine.

Dr. Michael Beyermann für Kooperation über Sortase-Inhibition und seine hilfreichen Diskussionen über Peptidchemie.

Dr. Stephan Pritz für die Kooperation über Sortase-Inhibition und sehr gute Zusammenarbeit.

Frau Dagmar Krause für die ständige Hilfe beim Reinigen einiger Peptidverbindungen.

Heike Nikolenko für ihre uneingeschränkte Hilfe am Anfang meiner Arbeit am FMP.

Dr. Peter Schmieder für Hilfe bei den NOESY, ROESY und anderen 2D-NMR-Messungen.

Dr. Eberhard Krause für die MALDI-Messungen.

Brigitte Schlegel für die Lösung aller technischen Probleme am NMR-Spektrometers.

Ihsanullah für die Zusammenarbeit im Rahmen seiner Einlernzeit.

Marianne Dreißigacker für ihre Übersicht im bürokratischen Chaos und ihre herzliche Art bei Hilfen.

der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT für die Finanzierung (DFG RA 895/2-3).

der Firma BOEHRINGER INGELHEIM für die finanzielle Unterstützung.

Franziska Gottschalk, Kevin Mallow und Viviane Uryga-Polowy für das gute Klima im Arbeitskreis.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mutter für ihre uneingeschränkte Unterstützung in meinem Aufenthalt in Deutschland, meiner Frau Falasteen und meinen vielen Kindern (wie das die Deutschen sagen) Rajee, Nina und Lima Noureen.

PROF. DR. JÖRG RADEMANN, FRAU KATHARINA KOSCHEK, ANDRE HORATSCHECK,
STEFANI GROSSKOPF, SINA MEYER, UND JÖRN SAUPE danke ich herzlich für das kritische
Korrekturlesen von Teilen des Manuskriptes.

Meiner Mutter und meiner Frau Falasteen gewidmet

Publikationsliste:

- 1. Selective identification of cooperatively binding fragments in a high-throughput assay enables the evaluation of picomolar caspase-3 inhibitor.** Schmidt, M.; El-Dahshan, A.; Keller, S.; Diel, A., Brock, R., Rademann, J. *Nat. Chem. Biol.* (in revision)
- 2. Sensitized Detection of Inhibitory Fragments and Iterative Development of Non-Peptidic Protease Inhibitors by Dynamic Ligation Screening** Schmidt, F.M.; Isidro, A.; El-Dahshan, A; Lisurek, M.; Hilgenfeld, R.; Rademann, J., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47(17), 3275-8.
- 3. C-Acylation of Polymeric Phosphoranylidenes Acetates for C-Terminal Variations of Peptide Carboxylic Acids** El-Dahshan, A.; Weik, S.; Rademann, J., *Org. Lett.*, **2007**, 6, 949-952.
- 4. C-Acylation of polymeric phosphoranylidenes acetates for C-Terminal Variations and conversions into peptide heterocycles** El-Dahshan, A.; Rademann, J. In *Peptides 2007: Proceedings of the 29th European Peptide Symposium 2007*, 730-732.
- 5. Versatile phosphoranes as linker reagents: Access to various isostere structures for protease inhibition via smooth C-C-couplings on polymer support** El-Dahshan, A.; Weik, S.; Rademann, J. In *Peptides 2005: Proceedings of the Third International Peptide Symposium 2005*, 623.

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
2 ALLGEMEINER TEIL	1
2.1 EINLEITUNG.....	1
2.2 KONFORMATION UND BIOLOGISCHE WIRKUNG	3
2.2.1 Grundprinzipien zur Restriktion und Fixierung von bioaktiven Konformationen.....	3
2.2.2 Heterozyklen-modifizierte Peptidmimetika	6
2.3 PROTEASEN ALS ATTRAKTIVE TARGETS FÜR DIE ENTWICKLUNG NEUER THERAPEUTIKA	9
2.3.1 Bedeutung und Einteilung der Proteasen	9
2.3.2 Spaltungsmechanismus der Proteasen	11
2.3.3 Nomenklaturkonvention zur Beschreibung von Wechselwirkungen zwischen Substraten und Proteasen	14
2.4 CC-VERKNÜPFUNGEN.....	16
2.4.1 Carbanionen-Äquivalente.....	16
2.4.2 C-Acylierung zur Synthese von Peptidmimetika	24
2.4.3 Nachteile der C-Acylierung in Lösung.....	26
2.4.4 C-Acylierung an der festen Phase	26
3 AUFGABENSTELLUNG	28
4 POLYMER-UNTERSTÜTZTE CARBOXYLATOPHOSPHORAN-YLIDE.....	29
4.1 EINLEITUNG.....	29
4.2 DARSTELLUNG VON 2'-TRIMETHYLSILYL- <i>N</i> -PEPTIDYL-4-AMINO-3-OXO-2- PHOSPHORANYLIDENBUTYLSÄUREESTER (54).....	33
4.2.1 Alkylierung und anschließende Deprotonierung zum polymeren 2-Phosphoranyliden acetat (52).....	33
4.2.2 C-Acylierung des Phosphoranylidenacetat (52) zum 2-Acyl-2-phosphoranyliden acetat (53).....	35
4.2.3 Festphasenpeptidsynthese am 2-acyl-2-Phosphoranylidenacetat (53) zu 2'- trimethylsilyl- <i>N</i> -peptidyl-4-amino-3-oxo-2-phosphoranyliden-butylsäureester (54) ...	38
4.3 SYNTHESE VON PEPTIDYL- α -KETOALDEHYDEN (57), UND DEREN ANWENDUNG ZU 1,3- DIAMINOPROPANOLEN SOWIE PEPTIDYL-HETEROZYKLEN.....	39
4.3.1.1 Synthese von Peptidyl-1,3-Diamino-2-hydroxy-propan (Peptidyl-1,3- Diaminopropanol) (71) ausgehend vom Peptidyl- α -Ketoaldehyd (57)	44
4.3.1.2 Synthese von Peptid-Heterozyklen ausgehend von biselektrophilen Produkten	51

4.3.1.3	Synthese von Peptidyl-Chinoxalin (72)	52
4.3.1.4	Synthese von Peptidyl- α -Ketoaldehyd mit Caspase-3-Erkennungssequenz (73a , 73b)	55
4.3.1.5	Synthese von Peptidyl- α -Ketoaldehyden mit Sortase-Erkennungssequenz (78) ...	58
4.4	VERWENDUNG VON PEPTIDYL-2,3-DIKETOESTER 55 FÜR DIE HETEROZYKLENSYNTHESE .	61
4.4.1	Oxidative Abspaltung des Peptidyl-2,3-Diketoesters vom Harz.....	61
4.5	PEPTIDYL-VINYLKETONE (58): WEITERER ZUGANG ZU C-TERMINALEN PEPTIDYL- HETEROZYKLEN	65
4.5.1	Durchführung der Wittig-Reaktion am polymergebundenen Peptidyl-3-amino-2-oxo-1- phosphosporanyliden propan (56)	65
4.5.2	Darstellung von Peptidyl-Vinylketonen	65
4.5.3	Darstellung von Peptidheterozyklen ausgehend von Peptidyl-Vinylketonen (58a-i)..	70
4.5.3.1	Darstellung von Peptidylpyrazolin (82) und die weitere Oxidation zum Peptidylpyrazol (83).....	70
4.5.3.2	Darstellung von Peptidyl-isoxazolinen 84	76
4.5.3.3	Synthese Peptidyl-3H-Benzodiazepinen (85).....	78
4.5.3.4	Synthese von Peptidyl-2,3-Dihydro-Thiazepinen (86)	80
4.5.3.5	Peptidylloxiran (88).....	83
4.6	DIE ERSTE FESTPHASENSYNTHESE VON <i>N</i> -ACYLIERTEN SPHINGOSINEN (93)	85
4.6.1	<i>N</i> -Acylierte Ketosphingosine (91a-c)	86
4.6.2	Stereoselektive Reduktion von <i>N</i> -acylierten Ketosphingosinen (90) zu <i>N</i> -acylierten Sphingosinen und anschließende Abspaltung der Schutzgruppe zu (93).....	90
4.6.3	Bestimmung der Zytotoxizität mit dem Alamar Blue Assay	92
4.6.4	Synthese von aromatenflankierten <i>N</i> -acylierten Sphingosinen.....	95
4.7	DIAMINOPENTENONE (104)	98
4.8	FESTPHASENSYNTHESE VON PEPTIDYLDIKETONEN (106).....	100
4.9	PEPTIDYL-METHYLBETONE UND -ETHYLBETONE (110 , 112)	104
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	109
6	EXPERIMENTELLER TEIL	114
6.1	CHEMIKALIEN UND LÖSUNGSMITTEL	114
6.2	GERÄTE UND ANALYTISCHE METHODEN.....	114
6.2.1	Dünnschichtchromatographie (DC)	114
6.2.2	Infrarotspektroskopie (FT-ATR-IR)	115
6.2.3	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC/MS).....	115

6.2.4	Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS)	115
6.2.5	Kernresonanzspektroskopie (NMR).....	115
6.2.6	Mikrowellenunterstützte Synthesen	116
6.2.7	Kaiser-Test	116
6.2.8	UV-spektrometrische Fmoc-Bestimmung zur Feststellung der Harzbelegung	117
6.2.9	Präparative HPLC.....	117
6.3	POLYMER-UNTERSTÜTZTE PEPTIDYLPHOSPHORANE	118
6.3.1	Synthese von 2`-trimethylsilyl- <i>N</i> -peptidyl-4-amino-3-oxo-2-phosphoranyliden-butylsäureester (54).....	118
6.3.2	Allgemeine Prozedur für die Synthese von Peptidyl-1,3-diamino-2-hydroxypropanderivaten (71)	122
6.3.3	Allgemeiner Synthesekonzept zur Herstellung von Chinoxalinsynthese ausgehend vom Peptidyl- α -Ketoaldehyd (66), und Peptidyl-2,3-Diketoester (55a).....	125
6.4	ALLGEMEINE PROZEDUR FÜR DIE SYNTHESSE VON PEPTIDYL-1-AMINO-3-BUTEN-4-ONE (PEPTIDYL-VINYLKETONE) (58A-H)	126
6.4.1	Synthese von Peptidylheterozyklen ausgehend vom Peptidyl-1-amino-3-buten-4-on (Peptidyl-Vinylketone) (58h , 58i).....	131
6.4.1.1	Allgemeine Vorschrift für die Synthese von Peptidylpyrazolinen (82a-d)	131
6.4.1.2	Oxidation von Peptidylpyrazolinen zu Peptidylpyrazolen (83).....	133
6.4.1.3	Isoxazolinsynthese (84)	135
6.4.1.4	Allgemeine Vorschrift der Peptidyl Diazepinsynthese (85) ausgehend vom Peptidyl-Vinylketon (58)	136
6.4.1.5	Peptidyl-2,3-Dihydro-Thiazepinen (86)	137
6.4.2	Oxiransynthese (88).....	140
6.5	SYNTHESSE VON <i>N</i> -ACYLIERTEN SPHINGOSINEN (93A-C)	141
6.5.1	Synthese von <i>N</i> -acylierten Ketosphingosinen (91a-c).....	141
6.6	PEPTIDYL-BIS(AMINO)-PENT-3-EN-2-ON (DIAMINOPENTENONE) 104.....	145
6.6.1	Synthese von Aminosäurealdehyde	145
6.6.2	Wittig Abspaltung zum Diaminopentenone (104)	146
6.7	ALLGEMEINE PROZEDUR FÜR DIE SYNTHESSE VON PEPTIDYLKETONE (110 , 112)	147
6.7.1	Synthese von Peptidylmethylketon (110) über die basische Hydrolyse	147
6.7.2	Synthese vom Peptidylethylketon (112) über die Alkylierung von (103) und anschließende basische Hydrolyse.....	148
6.8	ALLGEMEINE VORSCHRIFT FÜR DIE SYNTHESSE VON PEPTIDYLDIKETONE (106)	150

7 LITERATURVERZEICHNIS 151

1 Abkürzungsverzeichnis

Für Aminosäuren wurden die Vorschläge der IUPAC-IUB-Kommission und für biologische Nomenklatur [*Eur. J. Biochem.* **1984**, *138*, 9-37] des Ein- oder Dreibuchstaben-Code verwendet.

abs.	wasserfrei
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AA-OH	Aminosäure
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
BTFFH	Fluoro- <i>N,N,N',N'</i> -bis (Tetramethylen)formamidiniumhexafluorophosphat
COSY	Correlation Spectroscopy
d	dublett
δ	chemische Verschiebung
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIBAH	Diisobutylaluminiumhydrid
DIEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMDO	3,3-Dimethyldioxiran
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMP	Dess-Martin-Periodinan
DMSO	Dimethylsulfoxid
EA	Elementaranalyse
eq.	Äquivalente
ES-MS	Elektronenspray-MS
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
FBS	fetal bovine serum

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FT-ATR-IR	Fourier-Transform-Attenuated-Total-Reflection-IR
GC	Gaschromatographie
H	Stunde
HATU	N-[(Dimethylamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5b]pyridin-1-ylmethylene]-N-methylmethanaminium, Hexafluorophosphate N-Oxide
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol
HIV	human immunodeficiency virus
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatographie
IBA	Iodosobenzoensäure
IBX	Iodoxybenzoensäure
IR	Infrarot
kat.	Katalytisch
λ	Wellenlänge
m	Minute
M	Molarität
M	Merrifield-(Harz)
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MSNT	1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PASP	Polymer-Assisted-Solution-Phase
PEG	Polyethylenglycol
pH	potentia hydrogenii (pH-Wert)
ppm	parts per million
PS	Polystyrol
q	Quadruplett
R	Rest
rel. int.	Relative Intensität
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SPOS	Solid-Phase-Organic-Synthesis
SPPS	Solid-Phase-Peptide-Synthesis
TAS-F	Tris-(dimethylamino)-schwefel-trimethylsilyldifluorid
t	Triplett
VI	

t	Zeit
t _R	Retentionszeit
TBA-F	Tetrabutylammoniumfluorid
tBu	<i>tert.</i> -Butyl
TCP	Tritylchlorid-Polystyrol (1% Divinylbenzol)
TFFH	Tetramethylfluoroformamidiniumhexafluorophosphat
THF	Tetrahydrofuran
TIC	Totalionenchromatogramm
TFA	Trifluoressigsäure
TMS	Tetramethylsilan
TMSE	Trimethylsilylethylester
TOF	time-of-flight
Trt	Trityl
ÜN	Über Nacht
ÜZ	Übergangszustand
UV	Ultraviolett
V	Volumen
W	Wang-(Harz)
Z	Benzyloxycarbonyl (Cbz)

2 Allgemeiner Teil

2.1 Einleitung

Peptide und Proteine, die Übergänge zwischen diesen Verbindungsklassen sind fließend, sind in vielerlei Hinsicht essentielle Bestandteile von Organismen. Während den Proteinen vor allem biokatalytische Aufgaben sowie solche als wichtige Gewebebausteine zukommen, beeinflussen die Peptide vor allem als Hormone, Neurotransmitter und Neuromodulatoren nach Bindung an ihre membranständigen Rezeptoren die Zell-Zell-Kommunikation und kontrollieren eine Reihe vitaler Funktionen wie Stoffwechsel, Immunabwehr, Verdauung, Atmung, Schmerzempfindung, Reproduktion.^[1] Es ist bemerkenswert, dass native Peptide so starke biologische Wirkungen ausüben, obwohl die α -Aminosäuren, aus denen sie bestehen, relativ harmlose ungiftige Substanzen sind. Der Informationsgehalt eines Peptides ist nicht nur durch die Abfolge der Aminosäuren im Peptid (Primärstruktur) festgelegt, sondern begründet sich auch in der dreidimensionalen Konformation, in der das Peptid bei der Wechselwirkung mit einem Rezeptor vorliegt. In der medizinischen Chemie bedient man sich seit langem der Peptide und ihrer Analoga als Arzneimittel zur Therapie pathologischer Zustände, die zumeist durch eine Störung des Wechselspiels zwischen Botenstoffen oder Enzymsubstraten einerseits sowie ihren Adressaten, den Rezeptoren und Enzymen, andererseits gekennzeichnet sind.

Allerdings werden Peptide trotz ihrer vielseitigen Bioaktivitäten aus folgenden Gründen kaum als Wirkstoffe eingesetzt:

- A. geringe metabolische Stabilität bedingt durch schnellen proteolytischen Abbau
- B. geringe Bioverfügbarkeit durch die schnelle Ausscheidung durch Leber und Niere
- C. konformativ flexible Peptidliganden führen zu unselektiven Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Rezeptoren, was zu unerwünschten Nebenwirkungen führt.

Aufgrund dieser biochemischen und biophysikalischen Probleme beim Einsatz von Peptiden als Wirkstoffe versucht die medizinische Chemie verstärkt mit zwei ineinandergreifenden Konzepten diese Probleme zu überwinden. Neben der Suche nach Verbindungen, die bioaktive Peptide in ihrer Wechselwirkung mit Rezeptoren imitieren (Peptidmimetika) soll auch die gezielte Modifizierung von Peptiden, deren metabolische Stabilität, Aktivität und Selektivität erhöhen. Das Mittel beider Strategien ist dabei aber vor allem die Fixierung der konformativen, topochemischen Gegebenheiten des

rezeptorbindenden Peptidliganden, d.h. die optimale räumliche Präsentation der sogenannten pharmakophoren Gruppen.

Die klassischen Methoden der organischen Synthese sind jedoch mit der schnellen Bereitstellung großer Verbindungszahlen (Bibliotheken) zur Überwindung der o. g. Problemen überfordert. In diesem Zusammenhang steht die Forderung nach der Entwicklung neuer diversitätsorientierter Synthesekonzepte. Der Beitrag dieser synthetischen Arbeit ist die Entwicklung eines neuen Synthesekonzeptes zur Herstellung von Proteaseinhibitoren. Grundlagen des Konzeptes war die Etablierung eines polymergebundenen Carbanionen-Äquivalentes, das erfolgreich als Ausgangspunkt für die CC-Verknüpfung verwendet werden kann.^[2,3] Basierend auf dieser Strategie wurde die Synthese von Peptidelektrophilen sowohl mit tris- als auch bisfunktionellen Gruppen realisiert.^[4] Diese Verbindungsklassen sind potenziell vor allem als Cystein- aber auch als Serin-Protease Inhibitoren interessant.^[5,6] Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit war die Umwandlung der synthetisierten Strukturen zu Übergangszustandsisosteren wie z.B. den Hydroxyethylenaminen,^[7] und bislang wenig erforschten C-terminalen Peptidylheterozyklen,^[8,9] die als potenziell bioaktive Verbindungen von Interesse sind. Zu diesem Zweck wurden die drei synthetisierten Verbindungsklassen Peptidyl-diketoester, Peptidyl- α -Ketoaldehyde, Peptidyl-Vinylketone ausgehend vom entwickelten Synthesekonzept angefertigt. Das entwickelte Konzept erlaubte desweiteren die Konstruktion von Ceramiden und Peptidyl-diketonen.

Über den synthetischen Gesichtspunkt hinaus beinhaltet diese Arbeit die Anwendung der synthetisierten Peptidyl- α -Ketoaldehyde mit der geeigneten Sequenz gegen, Caspase-3^[10] und Sortase.^[11,12] Die synthetisierten Ceramide werden auch auf Cytotoxizität gegen verschiedene Krebszelllinien wie HEP-G2^[13], PC 12^[14] und HL 60^[15] untersucht.

In den folgenden Abschnitten des Allgemeinen Teils werden einige Themen, die im Zusammenhang mit dieser Arbeit stehen, näher erläutert.

2.2 Konformation und biologische Wirkung

2.2.1 Grundprinzipien zur Restriktion und Fixierung von bioaktiven Konformationen

Die Wechselwirkung von Peptidliganden mit Proteinrezeptoren bzw. Enzymen spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation von biologischen Prozessen, wobei der Peptidgeometrie eine besondere Bedeutung zukommt. Unter physiologischen Bedingungen steht ein Peptid in einem dynamischen Konformationsgleichgewicht, das abhängig von Temperatur und pH-Wert ist. Dies führt dazu, daß die entscheidende biologische Reaktivkonformation nur zu einem geringen Prozentsatz vorliegt. Diese Situation stellt sich besonders bei kleinen, linearen Peptiden z.B. Peptidhormonen ein. Verursacht wird diese Flexibilität durch die Rotation einzelner Bindungen der beteiligten Aminosäurereste, deren aneinandergereihte Abfolge das Peptidrückgrat bilden. Beschrieben wird die Geometrie des Peptidrückgrats durch die Torsionswinkel ϕ (ϕ), ψ (ψ) und Winkel ω (ω) der Peptidbindung (Abb. 1 A).

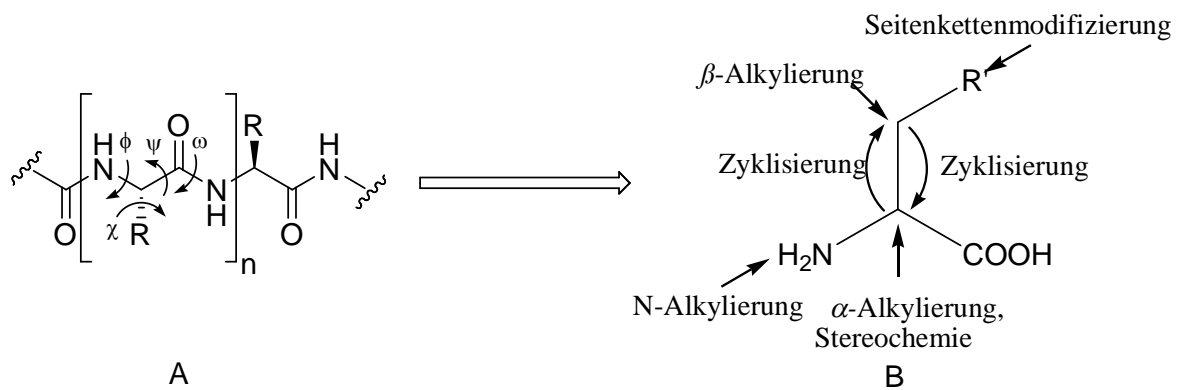
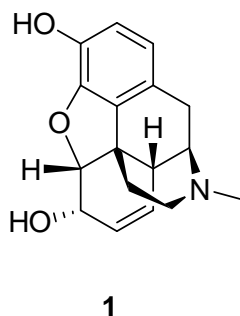


Abbildung 1: **A)** Anordnung eines beliebigen Aminosäurebausteins Xaa in der Peptidkette mit entsprechenden Torsionswinkeln ϕ , ψ und ω **B)** : Mögliche Konformationseinschränkungen von Peptiden durch die lokalen und regionalen Einschränkungen zur Optimierung der Selektivität, Affinität, Bioverfügbarkeit und Membrandurchgängigkeit.

Da die Peptidbindung auf Grund der Resonanzstabilisierung einen partiellen Doppelbindungscharakter besitzt, existieren zwei mögliche Rotationsisomere:

Die *trans* ($\omega = 180^\circ$) oder *cis* ($\omega = 0^\circ$) konfigurierte Peptidbindung. Die energetisch begünstigte *trans* Peptidbindung findet man in allen Peptiden, die kein Prolin enthalten. Generell bewirkt die planare Anordnung der vier Atome in der Peptidgruppe eine gleichzeitige planare Anordnung der beiden flankierenden $C\alpha$ -Atome, sodass die sechs Atome in einer Ebene zu liegen kommen und so eine partielle Starrheit der gesamten Peptidketten resultiert. Die Peptidbindung beschränkt somit die Zahl der möglichen Konformationen einer Polypeptidkette. Zur Charakterisierung der Konformation des Peptidrückgrats genügt daher in erster Näherung die Bestimmung der beiden Torsionswinkel Φ und ψ des jeweiligen Aminosäurerestes. Der Winkel Φ , der die Rotation entlang der N- $C\alpha$ Bindung beschreibt wird durch ein System von vier kovalent verknüpften Atomen C(O)-N-C-C(O) definiert. Analog definiert das System N- $C\alpha$ -C(O)-N den Winkel ψ , welcher die Rotation um die $C\alpha$ -C(O) Bindung beschreibt. Obwohl für die beiden Winkel Φ und ψ eine große Zahl möglicher Kombinationen existieren, führt die Größe, Polarität und Ladung der Seitenkette am $C\alpha$ -Atom zu einer weiteren Einschränkung der Rotationsfreiheitsgrade. Jedoch existieren, wie Modellrechnungen von *Ramachandran* zeigen, für jeden Aminosäurerest in einem Peptid bevorzugte Winkelkombinationen von Φ und ψ . Diese Vorzugskonformationen verhelfen dem Peptid zur Ausbildung favorisierter Sekundärstrukturen wie α -Helix, β -Faltblatt und Turns. Setzt man jedoch einen konformativ fixierten Liganden ein (Abb. 1 b), der auf Grund der Fixierung der für die Wirkung verantwortlicher Sequenz nur an einen bestimmten Rezeptor binden kann, so erhöht sich nicht nur die Selektivität des Liganden, sondern auch dessen Affinität zu diesem Rezeptor, da der Entropieverlust bei der Bindung in diesem Fall kleiner ist als bei der Bindung eines flexiblen Liganden.^[16,17] Die molekulare Erkennung eines Zielmoleküls ist nicht nur die Basis biologischer Regulation und Kommunikation, sondern auch die Grundlage für die Entwicklung neuer Pharmaka. Die Einführung verschiedener konformativer Einschränkungen kann ferner entscheidend zur Aufklärung der bioaktiven Konformation eines rezeptorgebundenen Peptids beitragen.^[18,19,20] Grundsätzlich werden zwei Arten zur Begrenzung der konformativen Freiheit unterschieden:^[1] Die Fixierung kann einerseits durch Einführung lokaler Einschränkungen erfolgen, andererseits können auch regionale Restriktionen zur Erreichung dieses Ziels eingesetzt werden. Unter lokalen Einschränkungen versteht man dabei alle Arten der Rückgratmodifizierung der Aminosäuren eines Peptids, die nicht mehr als zwei benachbarte Aminosäuren betreffen. Die wichtigste und am häufigsten angewandte Methode ist der Einbau sogenannter nicht-

ribosomaler oder nicht-kodierter Aminosäuren,^[1] die Einfluß auf die konformativen Parameter des Peptids nehmen können. Dabei kann die Substitution sowohl mit natürlich vorkommenden als auch mit künstlichen Vertretern erfolgen. Auch der Ersatz der Amidbindung durch isostere Gruppen, sowie Cyclisierungen der Seitenkette mit der NH- oder CO-Funktion der Amidgruppe der benachbarten Aminosäure können zu Einschränkungen der Torsionswinkel Φ und ψ der beiden Einfachbindungen einer Aminosäure beitragen.^[21,22] Aber auch cyclische Aminosäuren wie das natürliche Prolin tragen zur Begrenzung der konformativen Freiheit bei. Unter regionalen konformativen Einschränkungen fasst man dagegen die Verbrückung zweier entfernter (also nicht benachbarter) Aminosäurereste durch Cyclisierungen aller Art zusammen. Dazu gehören neben zyklischen Disulfiden auch die intramolekulare Verknüpfung zweier Seitenketten unter Ausbildung von Lactamen, Lactonen, Ethern oder Thioethern (häufig unter Beteiligung bifunktioneller Bausteine), aber auch Cyclisierungen von Seitenketten mit dem Peptidrückgrat oder Rückgrat-Rückgrat-Cyclisierungen, sowie weitere ungewöhnliche Verknüpfungen wie z. B. durch Kupplung aromatischer Ringe. Die größte Bedeutung aber haben die durch "Kopf-zu-Schwanz"-Cyclisierung von N- und C-Terminus gebildeten Cyclopeptide. Oft werden Sekundärstruktur-Mimetika (β -Turn-Mimetika etc.) und nicht-peptidische Gerüstmetetika (scaffolds) auch zur letzteren Gruppe gezählt.^[23] Durch den Austausch größerer Teile der peptidischen Leitstruktur gegen rigide Gerüste in der für die Bindung günstigen Anordnung bzw. als Rückgratersatz steigt mit Zunahme des nicht-peptidischen Charakters dieser Verbindungen deren metabolische Stabilität. Sie schließen damit die Lücke zwischen einfachen Peptidderivaten und vollständig nicht-peptidischen Mimetika, wie beispielsweise dem Morphin (Abb. 1). Das Morphin **1** imitiert den Effekt des aus 31 Aminosäure bestehenden des β -Endorphins **2** (eines endogenen Opioids) an eine für beide Verbindungen gleichen Erkennungstelle am Rezeptor.

**1**

Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-
Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Phe-Lys-Asn-
Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu

2

Abbildung 2: Struktur des Morphins **1** und des β -Endorphins **2**.

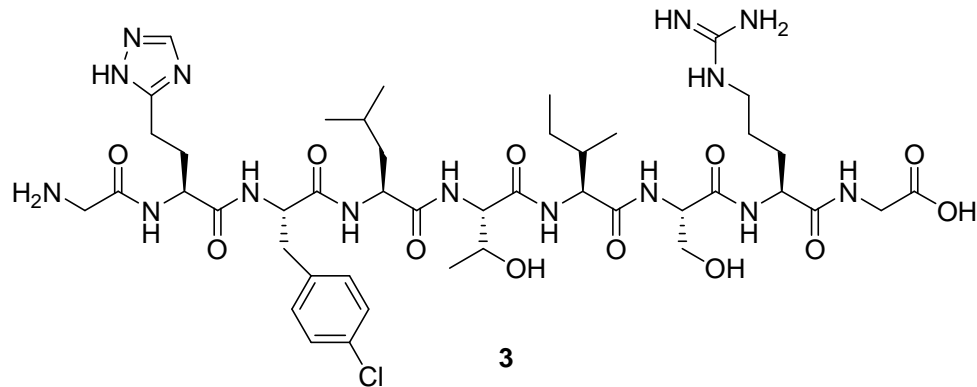
Gerade dieses Beispiel zeigt eindeutig, dass es möglich ist ein relativ großes Peptid durch eine niedermolekulare Verbindung zu ersetzen.^[24]

Allen Methoden zur Substitution und konformativen Einschränkung ist deren potenzieller Beitrag zur erhöhten Stabilität der Derivate gegen enzymatische Hydrolyse gemeinsam.^[25]

Bemerkenswerterweise haben die oben beschriebenen Prinzipien zur Restriktion und Fixierung bioaktiver Konformationen in den meisten Fällen Vorbilder in natürlichen, biologisch aktiven Peptiden.

2.2.2 Heterozyklen-modifizierte Peptidmimetika

Im Kap.1.2.1 wurden die verschiedenen Modifikationen zur Restriktion der Konformation von Peptiden beschrieben. Ziel aller Modifikationen ist das Erreichen einer optimalen bioaktiven Konformation des Liganden bei der Wechselwirkung mit dem Proteinrezeptor oder Enzym. Eine weitere interessante Einschränkung der Konformation, die in diesem Abschnitt behandelt wird, ist der Einbau von Heterozyklen am N- und C-Terminus, im Peptidrückgrat und am Aminosäurerest (Seitenkette) der peptidischen Sequenz.^[8,26] Viele isolierte Naturstoffe, die von großer biologischer Relevanz sind, enthalten Pyrazin-, Oxazol-, Thiazol- und Imidazol-Einheiten.^[27] Ausgehend von diesen Kenntnissen steigt das Interesse der medizinischen Chemiker an der Synthese von Heterozyklen-modifizierte Peptidmimetika. Heterozyklen-modifizierte Peptidmimetika als Proteaseinhibitoren können die hydrolytische Spaltung erschweren, die Membrangängigkeit der Peptidmimetika erhöhen, Wasser aus den Aktivtaschen auf Grund der Wechselwirkung mit den hydrophoben Aminosäurereste verdrängen und die Selektivität der Rezeptorbindung. Ein schönes Beispiel für die Heterozyklenmodifizierung am Rückgrat des Peptids von der Arbeitsgruppe Meldal ist das aus einer Bibliothek selektierte Peptidotriazol **3**, das im nanomolaren Bereich ($K_i=70$ nM) die Cysteinprotease (*Leishmania mexicana*) inhibiert.^[28]



Weitere Forschungsarbeiten zeigen, dass die Modifizierung mit dem Isothiazolidinon an der Seitenkette des Peptides **4** auch von großem biologischen Interesse ist. Das Isothiazolidinon ((S)-IZD) **4** wirkt dabei als Phosphotyrosin-mimetikum und ist bis jetzt der effektivste bekannte Inhibitor der Proteintyrosin Phosphatase 1B(PTP1B) (Abb. 3).^[29]

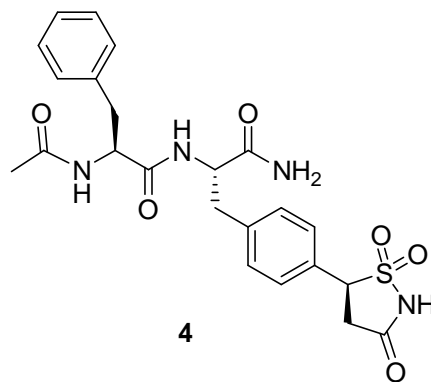


Abbildung 3: Isothiazolidinon-dipeptid **4** als PTP1B-inhibitor (Protein Tyrosine-phosphatase Inhibitor).

Eine weitere Optimierung der Substrate im Hinblick auf ihre biologische Aktivität ist die die N-Terminale Modifizierung mit Heterozyklen zwecks der oben genannten Vorteile. N-Terminale Peptidylheterozyklen wurden bereits als relevante Strukturen in der Literatur beschrieben. Einer der erst beschriebenen Substrate ist das Peptidyl-aminotriazol **5**, welches erfolgreich gegen den im Jahre 1990 identifizierten Thrombin Rezeptor (PAR-1) eingesetzt wurde (Abb.4).^[30]

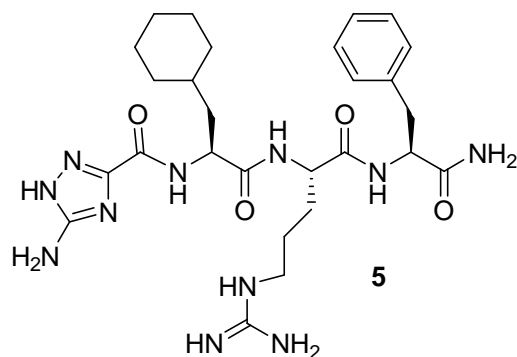


Abbildung 4: Peptidyl aminotriazol **5** ist der erstbekannte PAR-1 (Protease aktivierter Rezeptor) Agonist.

Im Jahre 1983 wurde der Wirkstoff Dolstatin **6** (Abb.5) erstmals aus der marinen schalenlose Molluske *dolabella auricularia* isoliert.^[31] Dolstatin ist ein weiterer Beleg dafür, dass die Konformationbeschränkung durch die Integration von Heterozyklen am C-Terminus von relevanter Bedeutung ist (Abb. 5).

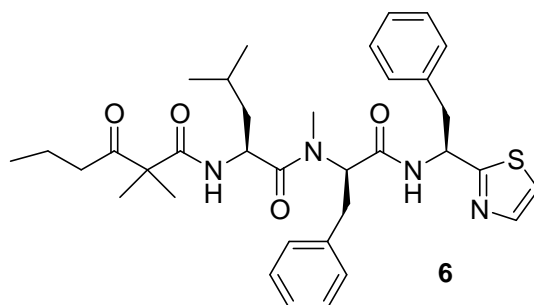


Abbildung 5: Dolstatin **6** ist einer der ersten C-terminalen Peptidheterozyklen, der effektiv das Wachstum humaner Zelllinien hemmt.

C-Terminale Peptidheterozyklen wurden auch erfolgreich gegen Proteasen wie Cystein- und Serinproteasen noch nicht umfangreich aber effektiv eingesetzt.^[8,9] Ein Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Synthese von C-terminalen Peptidheterozyklen als Proteaseinhibitoren. Eine Schlüsselrolle spielte hier die Entwicklung eines neuen Festphasen-gebundenen Carbanionen-Äquivalents, das einen eleganten Zugang zur erfolgreichen C-Acylierung eröffnet.

2.3 Proteasen als attraktive Targets für die Entwicklung neuer Therapeutika

2.3.1 Bedeutung und Einteilung der Proteasen

Proteasen, die auch Proteinasen oder proteolytische Enzyme genannt werden, sind verantwortlich für die Amidspaltung von Peptiden. Sie gehören damit zu einer sehr großen Gruppe von Proteinen, die immense physiologische Bedeutung haben. Sie sind an praktisch allen Abläufen wie z. B. Verdauung, Vermehrung, Wachstum, Differenzierung, Signalübertragung, Immunabwehr, Wundheilung, Zelltod etc. essentiell beteiligt. Neben der herausragenden Bedeutung bei Menschen und Tieren bedienen sich auch alle weiteren Formen des Lebens der Proteasen als molekulare Werkzeuge, d.h. sie sind auch in Bakterien, Viren, Protozoen, Pflanzen und Pilzen verbreitet. Es wird deshalb unmittelbar klar, dass sie vielversprechende Targets für Wirkstoffe darstellen. Zum einen können krankheitsbedingte Veränderungen des Proteosoms durch Einflussnahme über Wirkstoffe auf Proteasen behoben oder zumindest reguliert, zum anderen körperfremde Pathogene gezielt bekämpft werden. Über Proteasen ist somit eine Beeinflussung von Krebs- sowie Entzündungs-, Immun-, Atemwegs-, Herz-Kreislauf-, Infektions- und neurodegenerativen Erkrankungen möglich. Proteasen werden in der EC-Liste (Enzyme Commission) zur Unterklasse 3.4 aller Enzyme mit 13 Unter-Unterklassen zusammengefasst, wobei jedoch molekulare Strukturen und evolutionäre Beziehungen untereinander nicht berücksichtigt werden. Andererseits können die Peptidasen, ausgehend von der Basis ihrer Primär- und Tertiärstruktur, in Familien unterteilt und auf Grund ihres unterschiedlichen Katalysemechanismus (Tabelle 1) weiter klassifiziert werden.^[32]

Tabelle 1: Einteilung der Proteasen nach ihren katalytischen Typus.

Klasse	Aktives Zentrum	Familie
Serin-Proteasen	Serin, Histidin und Aspartat	S
Threonin-Proteasen	Threonin	T
Cystein-Proteasen	Cystein	C
Aspartat-Proteasen	Aspartat-Reste	A
Metallo-Proteasen	Metallion	M
Nicht klassifizierte Proteasen	divers	U

Jede Familie ist demnach durch einen Buchstaben, der den katalytischen Mechanismus wiedergibt und eine einzigartige Zahl gekennzeichnet. Dabei werden die Serin- und Threoninfamilien oft zusammengefasst dargestellt. Eine weitere Unterteilung erfolgt dann in Unterklassen, auch genannt Typen, die sich auf Grund struktureller Verwandtschaft und/oder des Motivs in der Abfolge der katalytischen Reste unterscheiden. Demnach werden beispielsweise Serinproteasen wie Trypsin mit einem „double β -Faß“ und der Aminosäuresequenz Asp, His, Ser ihrer katalytischen Reste dem Typ „SA“ zugeordnet, wohingegen die extrazelluläre Serinprotease Thermitase aus *Thermoactinomyces vulgaris* in der Faltung ein „parallel β -Platt“ und das Motiv Asp, His, Ser aufweist und somit dem Typ „SB“ zugeordnet wird. Bei den bislang bekannten Serinproteasen unterscheidet man folgende Clans, „SA“ („double β -Faß“/His, Asp, Ser), „SB“ („parallel β -Platt“/Asp, His, Ser), „SC“ (α,β Hydrolase/Ser, Asp, His), „SE“ (Helices und „ $\alpha+\beta$ sandwich“/Ser-Xaa-

Xbb-Lys), „SF“ („einzel β -Faß“/Ser, Lys, oder Ser, His), „SH“ („all β “/His, Ser, His) und „TA“ („ $\alpha, \beta, \beta, \alpha$ sandwich“/Threonin in den katalytischen Resten).

Darüber hinaus kann man die Proteasen zusätzlich anhand der Proteinsequenzposition der Spaltung von Peptid- und Proteinsubstraten in Exopeptidasen, das sind Proteasen verantwortlich für Spaltungen am N- oder C-Terminus der Proteinsequenz (Tab. 2) und Endopeptidasen mit Spaltung von sequenzinternen Peptidamidbindungen, einteilen.

Tabelle 2: Einteilung der Exoproteasen nach Anzahl und Lage der abgespaltenen Aminosäuren.

Exopeptidasen	Anzahl/Lage der Abspaltung
Amino-peptidasen	1 Aminosäure/ N-terminal
Dipeptidyl-Peptidasen	2 Aminosäuren/ N-terminal
Tripeptidyl-Peptidasen	3 Aminosäuren/ N-terminal
Carboxy-Peptidasen	1 Aminosäure/ C-terminal
Peptidyl-Dipeptidasen	2 Aminosäuren/ C-terminal

2.3.2 Spaltungsmechanismus der Proteasen

Die Serin-, Threonin- und Cysteinpeptidasen unterscheiden sich mechanistisch sehr stark von Aspartat- und Metallopeptidasen. Im ersten Falle ist das an der Spaltung der Peptidbindung beteiligte Nukleophil am Ort der Katalyse eine Aminosäure, im zweiten Falle handelt es sich meist um ein aktiviertes Wassermolekül.^[33]

Beim Spaltungsmechanismus der Serin-, Cystein- und Threoninpeptidasen (Abb. 6) wird eine OH- bzw. SH-Gruppe durch ein Histidin deprotoniert und ein peptidisches Substrat,

das dabei meist durch ein sogenanntes, von Aminosäuren des Enzyms ausgebildetes „oxy-anion-hole“ über Wasserstoffbrückenbindungen in Position gehalten wird, nukleophil an der zu spaltenden Peptidbindung angegriffen. Daraus erfolgt ein tetraedrischer Übergangszustand, von dem sich das Amid der Peptidbindung als *N*-terminales Amin, durch Deprotonierung des Histidins, lösen kann. Das daraus resultierende aktivierte Acyl-Enzym-Intermediat kann nun durch ein Wassermolekül nukleophil attackiert werden, wobei eine C-terminale freie Säure entsteht und der ursprüngliche Ausgangszustand der beteiligten katalytischen Aminosäuren des Enzyms den Katalysezyklus schließt.

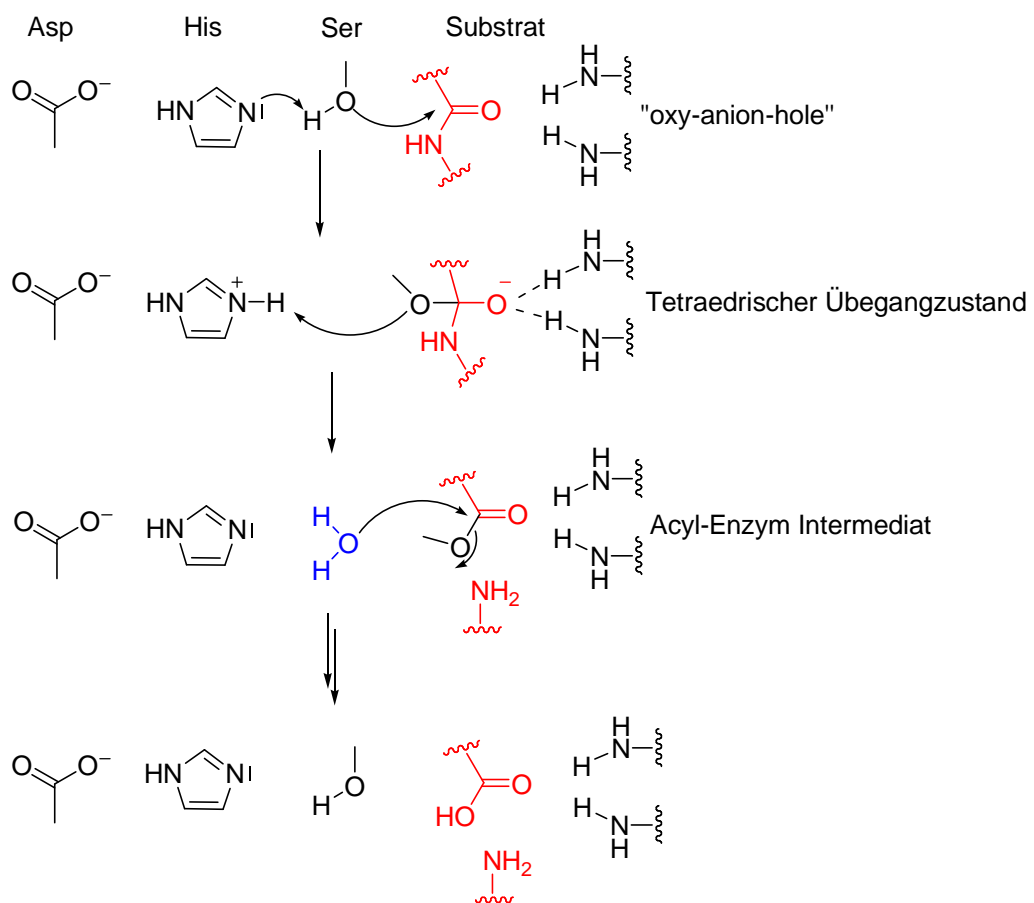


Abbildung 6: Spaltungsmechanismus der Serin-, Cystein- und Threoninprotease am Beispiel einer Serinprotease.

Aspartylproteasen bedienen sich zur katalytischen Spaltung von Peptidbindungen eines anderen Mechanismus (Abb. 7). Dabei wird ein Wassermolekül im katalytischen Zentrum, zwischen einem Aspartat und einer Asparaginsäure, vom Aspartat zum Hydroxyanion deprotoniert, das dann unmittelbar das angelagerte peptidische Substrat nukleophil

angreifen kann. Das entstandene Sauerstoffanion der Peptidbindung deprotoniert die Asparaginsäure wiederum zum Aspartat, wobei sich am Substrat selbst ein Hydrat als Übergangszustand ausbilden kann. Zum Abschluss des Katalysezyklus löst sich das Amid der Peptidbindung als *N*-terminales Amin.

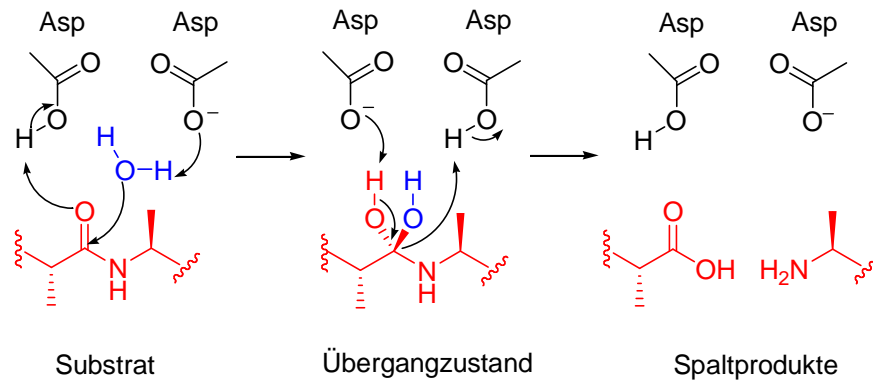


Abbildung 7: Spaltungsmechanismus der Aspartylproteasen.

Der exakte katalytische Mechanismus von Metallopeptidasen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Essentiell für die Enzymaktivität sind dabei Metallionen, oft Zinkkationen, die von verschiedenen Aminosäuren im katalytischen Zentrum komplexiert werden. Das Zink liegt dabei als zweifach geladenes Kation vor, was zur Amidspaltung ausgenutzt werden kann. Am Beispiel der bakteriellen Metallopeptidase Thermolysin (Abb. 8) kann ein grundlegender Mechanismus veranschaulicht werden. Die Carbonylgruppe des peptidischen Substrates wird im katalytischen Zentrum polarisiert. So wird ein nukleophiler Angriff durch ein Wassermolekül, das ebenfalls polarisiert wird, ermöglicht. Anschließend wird ein daraus resultierender, tetraedrischer Übergangszustand durch das Zinkkation stabilisiert. Dabei spielen auch weitere Aminosäuren, wie eine Glutaminsäure und ein weiteres Histidin, im katalytischen Zentrum eine wichtige Rolle. Diese wirken ebenfalls polarisierend und komplexierend am Katalysezyklus mit. Im abschließenden Spaltungsschritt wird das Amid der Peptidbindung als *N*-terminales Amin abgelöst und durch eine Glutaminsäure stabilisiert. Die C-terminale freie Säure liegt nun weiterhin stabilisiert im katalytischen Zentrum vor und kann danach freigesetzt werden.

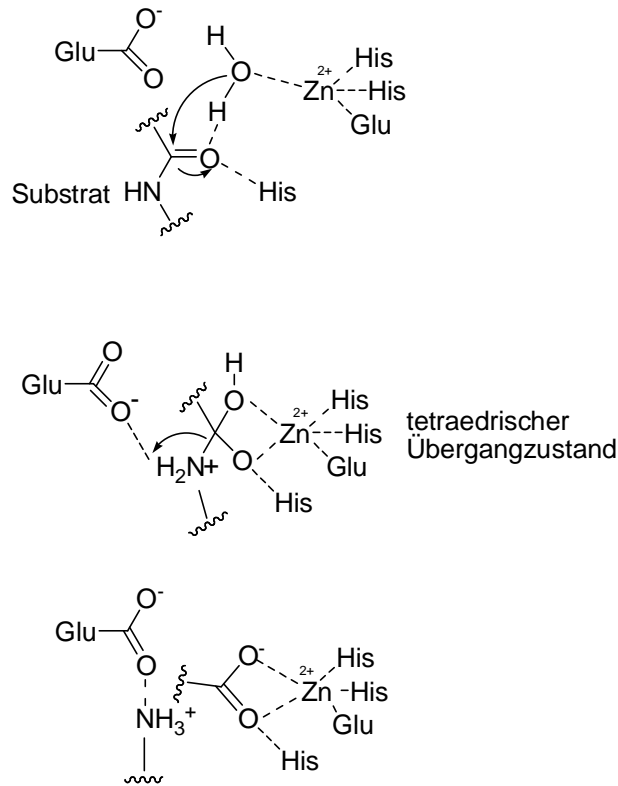


Abbildung 8: Spaltungsmechanismus von Metallproteasen am Beispiel des Thermolysins.

2.3.3 Nomenklaturkonvention zur Beschreibung von Wechselwirkungen zwischen Substraten und Proteasen

Zur Beschreibung von Interaktionen zwischen Substraten bzw. Inhibitoren und Proteasen wird standardmäßig die von Schechter und Berger (Abb. 9) eingeführte Nomenklatur verwendet.^[34] Ein Peptidsubstrat wird hierbei an seinen Aminosäureresten, die mit den räumlichen Strukturen der Enzymoberfläche bei der Spaltung nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip interagieren können, mit dem Buchstaben P (Abb. 9) bezeichnet.

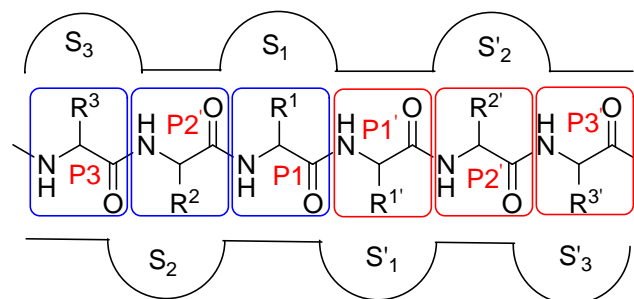


Abbildung 9: Konvention zur Nomenklatur von Substrat und Bindungstaschen.

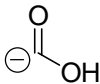
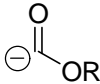
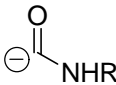


Bindungstaschen, die sich aufgrund der Oberflächenstruktur des Enzyms ergeben und an der Substratspaltung mechanistisch wie substratselektiv beteiligt sind, erhalten den Buchstaben S, der dabei für „Subsite“ steht. Ausgehend vom Ort der Spaltung, der auch als „active site“ bezeichnet wird und wo die Spaltung der Konvention nach zwischen der S1- und der S1'-Tasche stattfindet, werden alle weiteren Bindungstaschen, die mit den N-terminalen Resten des Substrates interagieren, mit S1, S2, S3, usw. bzw., die mit den C-terminalen Resten des Substrates interagieren, mit S1', S2', S3', usw. benannt. Darausfolgend erhalten die zugeordneten Aminosäurereste des Substrates N-terminal P1, P2, P3, usw. und C-terminal P1', P2', P3', usw. als Bezeichnung. Für Elemente natürlicher und synthetischer Inhibitoren wird die Substratnomenklatur mit dem Buchstaben P übernommen.

2.4 CC-Verknüpfungen

2.4.1 Carbanionen-Äquivalente

Die Grundvoraussetzung für CC-Verknüpfungsreaktionen ist, dass neben einem elektrophilen Kohlenstoffzentrum ein nucleophiles Zentrum mit carbanionischem Charakter vorhanden sein muß. In Anlehnung an diese Tatsache wird im Rahmen dieser Arbeit ein polymergebundenes Carbanionen-Äquivalent als Elektrophil mit voraktivierten Aminosäuren als Nucleophil für die CC-Verknüpfung verwendet. Formal lassen sich zum Aufbau der Zielverbindungen Acylanionen als Synthone formulieren, die jedoch als Reagenz nicht verfügbar sind (Tab. 3).

Tabelle 3: Acylanionen-Äquivalente, die nur formal existieren.

Acylanion-Äquivalent	Formale Struktur
Carboxyanion	
Formylesteranion	
Formamidation	
Formylanion	
Acylanion	

Aus diesem Grund werden synthetisch unterschiedlich maskierte Anionen-Äquivalente eingesetzt. Entsprechende d^1 -Synthons verfügen über ein von positiv nach negativ umgepoltes Kohlenstoff-Atom, aus welchem nach Umsetzung mit dem Elektrophil die gewünschte Funktionalität zurückerhalten wird. SEEBACH *et al.* waren im Jahre 1969 die

ersten, die umfangreich das Konzept der Reaktivitätsumpolung vor allem von 1,3-Dithianen als Acylanionen-Äquivalente eingeführt haben ^[35,36]. Dabei wurden Dithiane **7** als Acylanion-Äquivalente verwendet (Abb. 10).

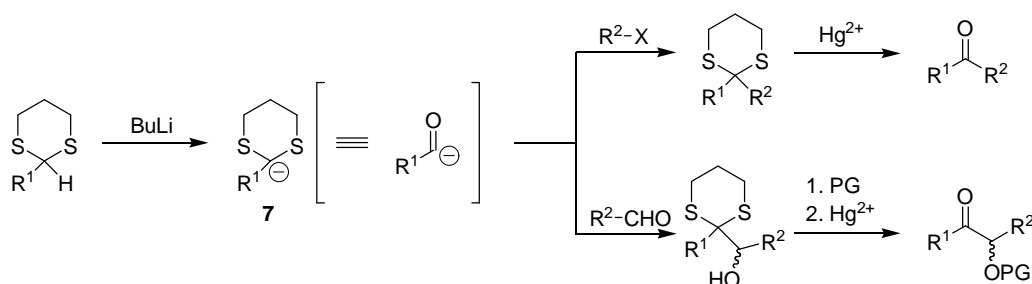



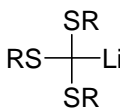


Abbildung 10: Methode der Reaktivitätsumpolung nach SEEBACH.

Bausteine zur C_1 -Verlängerung lassen sich entsprechend auch als maskierte Carboxy- bzw. Formylesteranionen interpretieren, wobei berücksichtigt werden muss, dass nicht nur das Äquivalent selbst, sondern auch die Art der Demaskierung auf die letztlich erhaltene Funktionalität Einfluss nimmt.

Tabelle 4: Maskierte Carboxy- und Formylester-Carbanionen-Äquivalente zur C_1 -Verknüpfung.

Nr.	Formylesteranionen-Äquivalent
1	8
2	9
3	10
4	11
5	12 M=Li;MgBr

Fortsetzung Tab. 4

Nr.	Formylesteranionen-Äquivalent
6	 13
7	 14
8	 15
9	 M=MgBr 16

Die maskierten Enoether-Derivate **8, 9, 10, 11** und die daraus ableitbaren Vinylthioether und Enamine sind auch bekannt als maskierte Acylanionen, weil sich bei der Hydrolyse Carbonyl-Gruppen freisetzen lassen (Tab. 4).

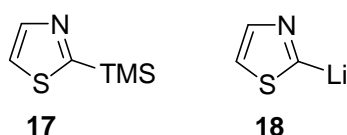
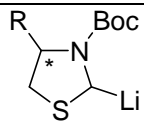
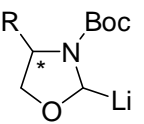
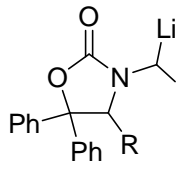


Abbildung 11: Lithierte und trimethylsilylierte Thiazole als Formylanion-Äquivalente.

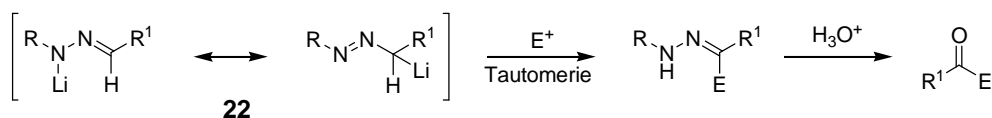
Lithierte und trimethylsilylierte Thiazole **17, 18** gehören zu den Formylanion-Äquivalente, bei denen die entstehenden Aldehyde zu Carbonsäuren leicht oxidiert werden.

Tabelle 5: Metallierte Heterocyclen zur enantio bzw. diastereoselektiven nucleophilen Addition.

Metallierte Heterocyclen	Struktur	
Lithiiertes Thiazolodin		19
Lithiiertes Oxazolodin		20
Lithiiertes Oxazolidinon		21

Metallierte chirale Heterocyclen, die in Tabelle 5 geschildert sind, eignen sich für enantio- oder diastereoselektive nucleophile Addition an Elektrophile wie z.B. Aldehyde. Aus den verwendeten Heterocyclen wird hydrolytisch die Carbonyl-Gruppe erhalten.^[37, 38]

Weiterhin große Bedeutung als Acyl- bzw. Formylanion-Äquivalente haben substituierte Hydrazone erlangt.^[39,40] *BALDWIN et al.* verwendeten dabei lithiierte *N*-monoalkylsubstituierte Hydrazone (Azoanionen) **22**. Solche, mit einer sperrigen *N*-Alkylgruppe versehene Spezies verfügen über stark ausgeprägte *C*-Nucleophilie, was durch Formulierung mesomerer Grenzstrukturen verdeutlicht werden kann, und sind zu Substitutions- oder Additions-Reaktionen mit z. B. Halogenalkanen, Aldehyden, Ketonen und Michael-Substraten befähigt. Abschließende Hydrazon-Hydrolyse führt zur entsprechenden Carbonyl-Verbindung.


Abbildung 12: Lithiierte *N*-monoalkylsubstituierte Aldehydhydrazone als Acylanion-Äquivalente.

Bereits 1968 konnten *BREHME et al.* zeigen, dass *N,N*-dialkylsubstituierte Aldehydhydrazone bei entsprechenden Substituenten bereits an sich über *C*-Nucleophilie

verfügen. Hauptsächlich wurden dabei von N,N-Dimethylhydrazin und 1-Aminopyrrolidin abgeleitete Phenyl- und einfache Alkylhydrazone untersucht. Die Nucleophilie am eigentlich positiv polarisierten Hydrazon-Kohlenstoff lässt sich durch die Donor-Funktion des freien Elektronenpaares am dialkylsubstituierten Stickstoff erklären, die besonders bei Einbindung dieses Stickstoffs in einen Fünfring stark ausgeprägt ist. Weiter verdeutlichen lässt sich der carbanionische Charakter durch die Verwendung der Bezeichnung „Azaenamin“ **23**. In zahlreichen Veröffentlichungen wurden als Elektrophile Sulfonylisocyanat sowie MANNICH- und VILSMEIER-Iminium-Reagenzien eingesetzt.^[41]

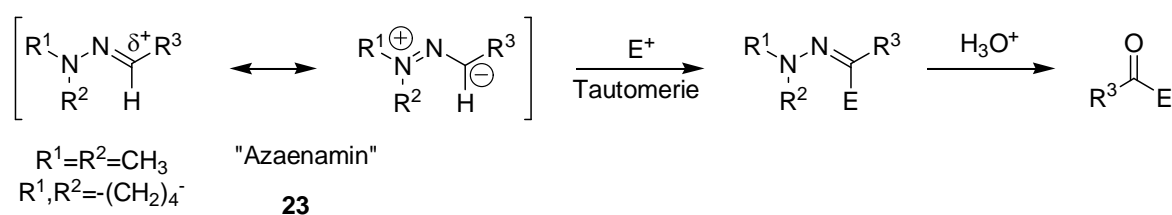


Abbildung 13: Nucleophile N,N-Dialkylhydrazone als Aza-analoge Enamine (Azaenamine).

Aufgegriffen wurde das Konzept in jüngster Zeit in einer Kooperation der Arbeitsgruppen LASSALETTA und ENDERS.^[42,43]

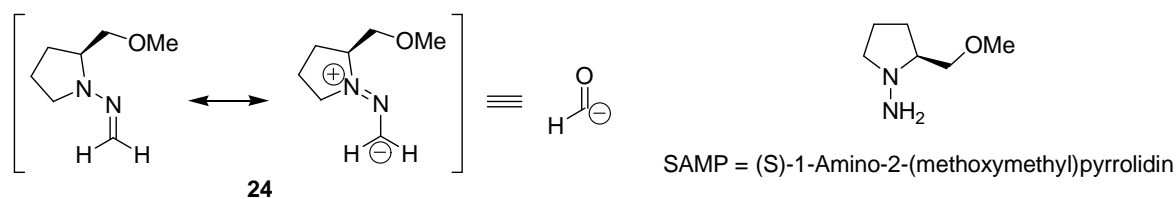


Abbildung 14: SAMP-Formaldehydhydrazone (Azaenamine) als Formylanion-Äquivalente.

Es werden dabei mit SAMP-analogen N,N-Dialkylhydrazinen Formaldehyd-N,N-dialkylhydrazone **24** gebildet, welche Formylanionen repräsentieren und verschiedene Substrate nukleophil angreifen können als Substrate werden (aktivierte) Aldehyde^[44,45], Nitroolefine^[46], Iminium-Ionen, α,β -ungesättigte Carbonyl-Verbindungen^[47] und Trifluormethyl-ketone^[48] verwendet, wobei z. B. die Elektrophilie der Aldehyde zum Teil durch Lewis-Säure-Katalyse erhöht wird. Für die Freisetzung der Zielverbindungen aus

den Hydrazonen sind eine Vielzahl von Varianten entwickelt worden, typischerweise wird aber eine Ozonolyse der C-N-Doppelbindung und reduktive Aufarbeitung mit Dimethylsulfid präferiert.

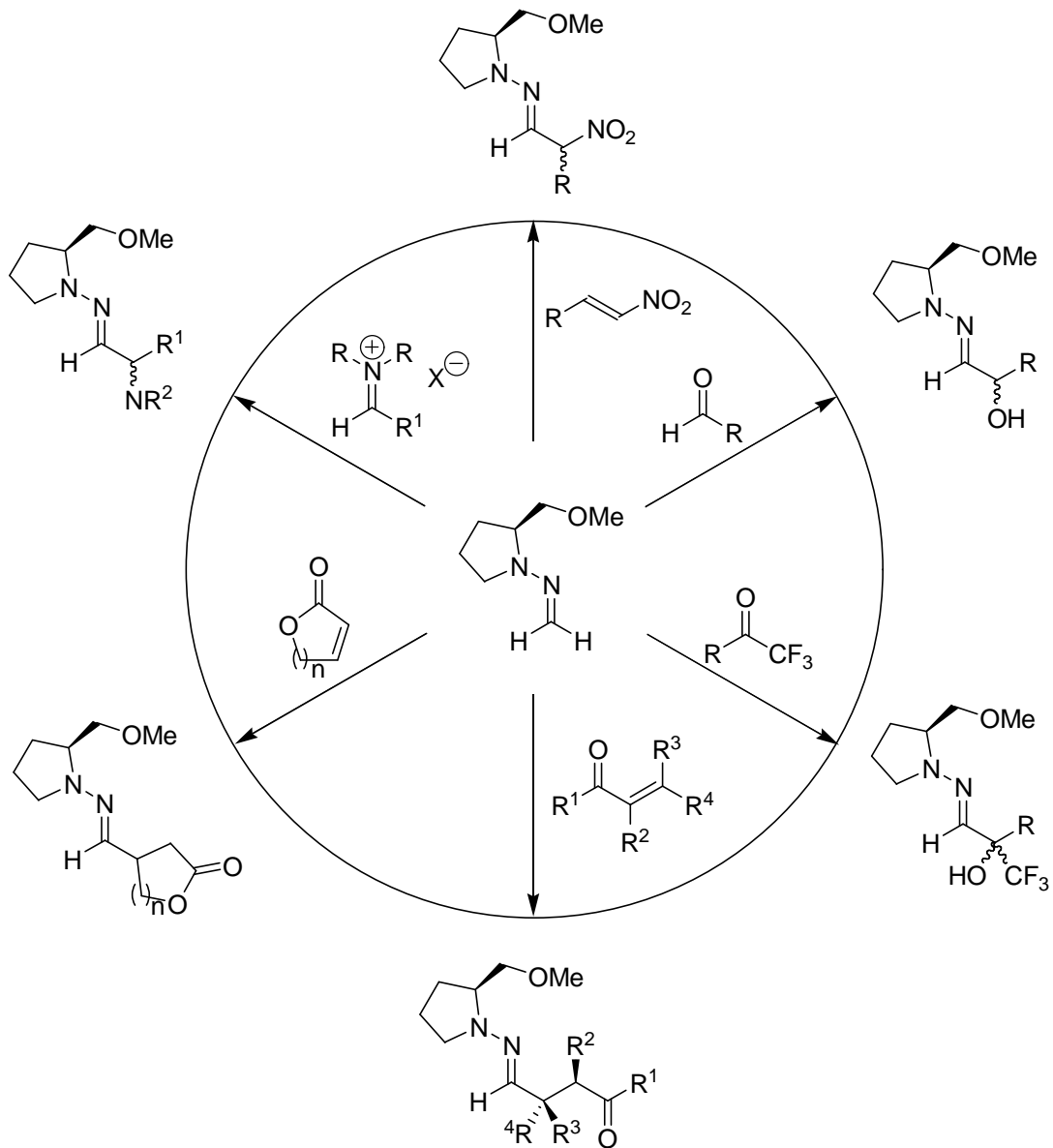


Abbildung 15: Addition von SAMP-Formaldehydhydrazonen an verschiedene elektrophile Substrate.

Synthese-Äquivalente mit bemerkenswerter Reaktivität sind auch die verschiedensten Formen so genannter 1,1-Dipol-Synthone. Bei diesen Spezies sind die Eigenschaften eines Acylanions und -kations auf einem Kohlenstoff-Atom vereint, so dass sie sowohl α^1 -als auch δ^1 -Synthons fungieren. Die Reaktivität besitzt Ähnlichkeit mit der des

Kohlenmonoxids CO, welches bei allen Übergangsmetall-katalysierten Carbonylierungsreaktionen im Bereich der Anorganischen Chemie sowohl Donor- als auch Akzeptorverhalten zeigt.

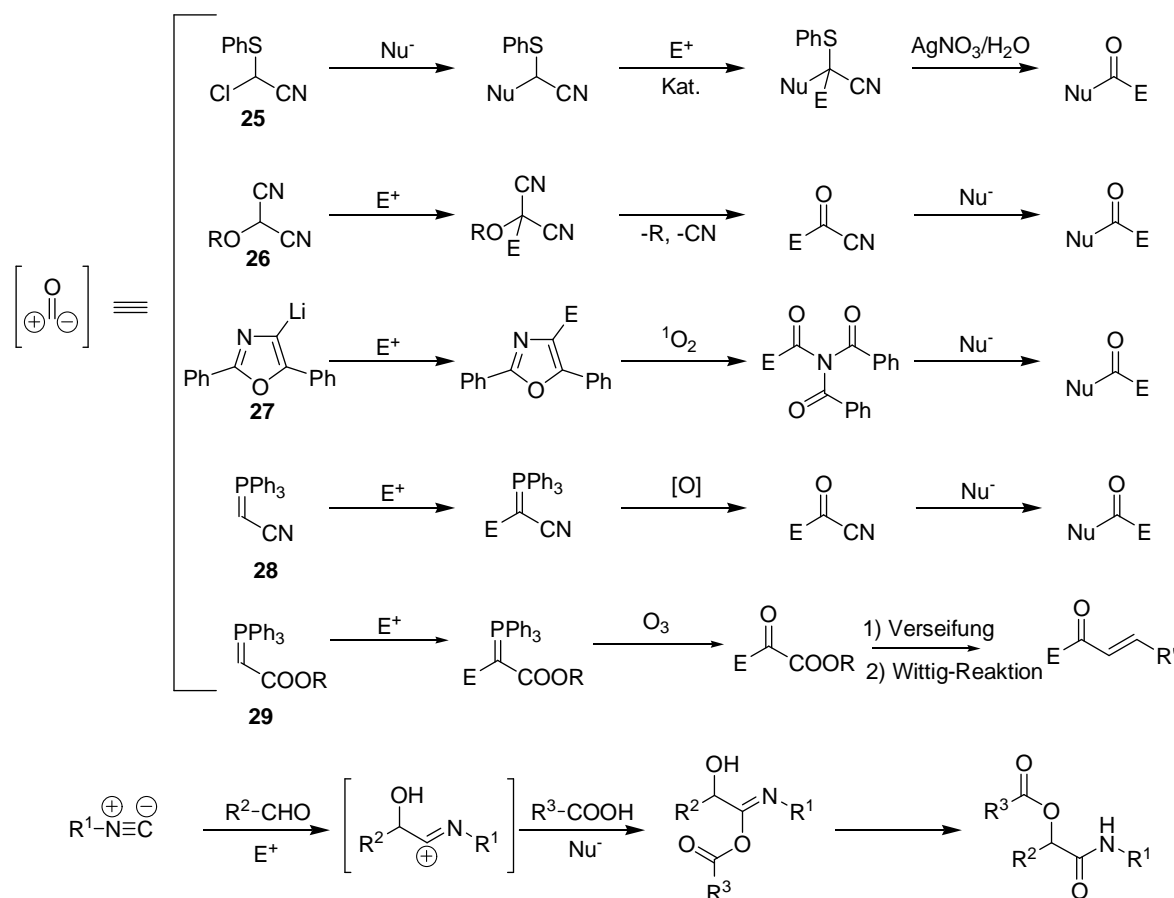


Abbildung 16: Verschiedene 1,1-Dipol-Synthons und ihre Umsetzung mit Elektrophilen und Nucleophilen.

Bekannte 1,1-Dipol-Synthons sind Chlor-(phenylthio)-acetonitril **25**,^[49] Alkoxymalodinitril **26**^[50] sowie lithiiertes Oxazol**27**.^[51] Die (Cyanmethyl)phosphorane,^[52] die auch von unserer Arbeitsgruppe als Carbanionen-Äquivalente untersucht worden sind, sind auch dieser Synthon-Klasse zuzuordnen. Auch die im Sinne einer PASSERINI-Reaktion eingesetzten Isonitrile können in diesem Kontext als 1,1-Dipole aufgefasst werden, da es sich bei ihnen formal um die Imine des Kohlenmonoxids handelt. Ebenso sind Schwefel-Ylide dipolare Synthons. Auffallend in den Strukturen ist das häufige Auftreten der Cyanogruppe. Ursache dafür ist, dass eine Cyanogruppe induktiv einen α -Kohlenstoff positiv polarisiert, damit die Acidität eines Wasserstoffatoms an einem α -

Kohlenstoffatom erhöht, nach einer Deprotonierung ein entstehendes Carbanion durch Mesomerie stabilisiert und schließlich eine sehr gute Abgangsgruppe darstellt. Aus diesem Grund lassen sich Cyanid-Ionen, wie z. B. in der Benzoin-Kondensation (Abb. 17), katalytisch zur Generierung intermediärer Carbanionen **30** einsetzen. Sehr ähnlich verhalten sich in derselben Reaktion katalytisch eingesetzte Thiazolium-Salze. Thiazolium-Salze lassen sich leicht in der 2-Position am Heteroaromaten zur Ylid-Struktur deprotonieren **31** und können z. B. Benzaldehyde nucleophil angreifen. Ein intermediär ausgebildetes Carbanion am so genannten Aktivvaldehyd **32** wird durch Mesomerie unter Ringbeteiligung stabilisiert und kann einen weiteren Benzaldehyd attackieren. Zum Ende des Katalyse-Zyklus fungiert das Thiazolium-Salz als Abgangsgruppe. Der Einsatz der Thiazolium-Salze für diese Reaktion ist der Wirkungsweise des natürlichen Thiamins (Vitamin B₁), welches als Thiaminpyrophosphat das Coenzym der Transketolasen und Decarboxylasen darstellt, nachempfunden. Davon abgeleitete, vereinfachte Thiazolium-Katalysatoren werden in der organischen Synthese z. B. in der STETTER-Reaktion eingesetzt.^[53]

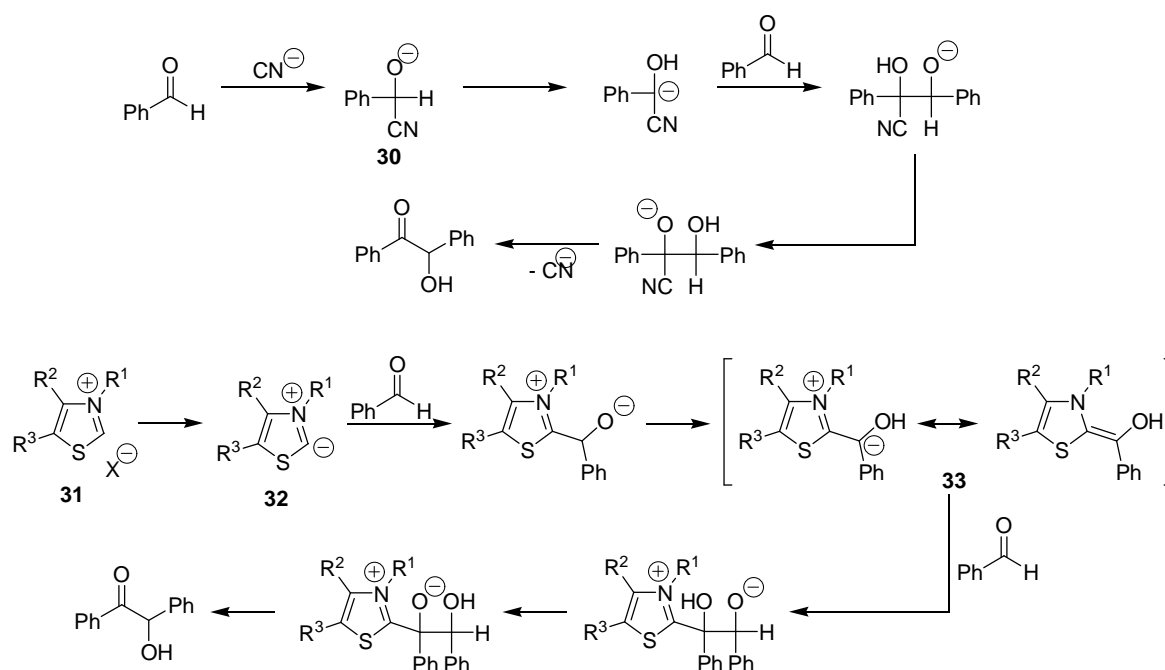


Abbildung 17: Cyanid- und Thiazolium-katalysierte Benzoin-Kondensation.

Die Übertragung der in diesem Kapitel vorgestellten Carbanionen-Äquivalente an die feste Phase zur Konstruktion von Peptidisosteren scheint leider nicht immer durchführbar zu

sein. Bei der Betrachtung der vorgestellten Methoden wird deutlich, dass der bei weitem größte Teil aus lithiierten Spezies besteht. Die Verwendung sehr starker Basen und die Feuchtigkeitsempfindlichkeit erschweren die Generierung eines Carbanions in einem Polymer. Der einfachere und oft genutzte Weg ist deshalb die Immobilisierung eines Substrates, welches als Elektrophil mit in Lösung *in situ* metallierten Spezies abreagiert. Auf diese Weise wurde z. B. in der AK G. JUNG eine Verlängerung eines Polymergebundenen Aldehyds zum α -Hydroxyaldehyd mit Lithiumthiazol nach DONDONI durchgeführt.^[54] Da bei einem Zielmolekül von noch deutlich peptidischer Struktur eine Kettenverlängerung am C-Terminus erfolgen muss, kann in diesem Fall der C-Terminus, wie ansonsten bei Peptidsynthesen üblich, nicht zur Immobilisierung verwendet werden. Außerdem wird bei einer Immobilisierung über den N-Terminus die problematischere, inverse Peptidsynthese nötig. Aus diesen Gründen wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe bei der Entwicklung von polymeren Anionen-Äquivalenten, welche auch als Linker fungieren können, die vorgestellten (Cyanmethylen)phosphorane ausgewählt. Das entwickelte polymergebundene (Cyanmethylen)phosphoran wurde anschließend erfolgreich zur Synthese von Peptidisosteren mit dem Norstatin-Motiv verwendet.^[8,9] Als Erweiterung dieser erfolgreichen Arbeit sollte ein neues Carbanionen-Äquivalent zur Synthese von Proteaseinhibitoren entwickelt werden.

2.4.2 C-Acylierung zur Synthese von Peptidmimetika

C-Acylierungen spielen eine entscheidende Rolle bei der Synthese von den meisten Peptidisosteren wie beispielhaft Statine und Norstatine.^[55,56] C-Acylierungen ermöglichen die Variation an der isosterischen Position und die Seitenkette, was bei der Konstruktion von Proteaseinhibitoren relevant ist. Jedoch die bis jetzt bekannten Strategien zur CC-Verknüpfung finden in der Lösung statt.^[57,58] Damit ist die Variation an der isosterischen Position limitiert. Eine attraktive Alternative dafür ist die Durchführung der CC-Verknüpfung an der festen Phase, was zum Schwerpunkt dieser Arbeit sein wird. Zunächst wird in den folgenden Abschnitten die Möglichkeit der CC-Verknüpfungen präsentiert.

C-Acylierung auf Basis der (Carboxylatmethylen)phosphoranen in Lösung

Stabilisierte Wittig-Ylide **36** mit elektronenziehenden Gruppen sind nicht nur für Carbonyl-Olefinierungen geeignet, sondern auch für C-Acylierungen. *G. Märkl et al.* war der erste, der auf Basis der (Carboxylatmethylen)phosphorane die Acylierung mit Säurechloriden etabliert hat (Abb. 18).^[59] Diese Methode wurde seit der 1989 von der AG Wassermann aufgegriffen und zur Synthese von Tricarbonyl-Verbindungen **38** verwendet.^[60,61] Dabei wird das Triphenylphosphin **34** mit Bromessigester zum Phosphoniumsalz **35** alkyliert und anschließend zum Wittig-Ylid **36** deprotoniert. Die Acylierung mit einer Carbonsäure und EDCI/DMAP als Kupplungsreagenz führt zum (Acylmethylene)phosphoran **37** (Abb. 18). Nachteil solcher Methoden ist z. B. die Aufarbeitung und das Entfernen des entstandenen Phosphinoxides. Außerdem ist die freie Variation der Reste in der klassischen Lösungsmittelchemie limitiert.

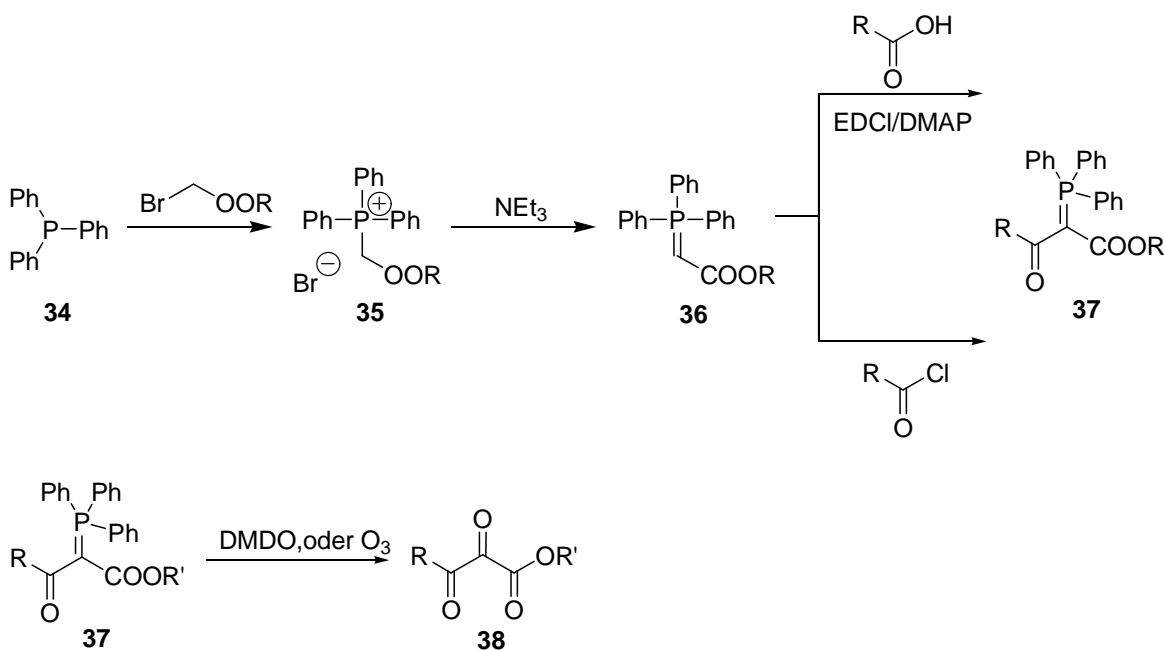


Abbildung 18: C-Acylierung am (Carboxylatmethylen)phosphoranen **36** in Lösung nach Märkl- und Wassermann-Konzept.^[52,83]

Über die normale Wittig-Reaktion hinaus können polymergebundene (Carboxylatmethylen)phosphorane **52** (Abb. 21) als Carbanionen-Äquivalente bzw. als

1,1-Dipol-Synthons im Sinne einer Festphasensynthese vielseitig eingesetzt werden. In dieser Arbeit wird der Einsatz der polymergebundenen Carbanionen-Äquivalenten in der Synthese von Peptidmimetika und die Untersuchung der Variationsmöglichkeiten unterschiedlicher Substituenten in allen relevanten Positionen untersucht.

2.4.3 Nachteile der C-Acylierung in Lösung

Die Möglichkeit der C-Acylierung in Lösung wurde seit 1989 von Wassermann ausgehend sowohl von den (Carboxylatmethylen)- als auch von (Cyanomethylen)phosphoranen aufgegriffen. Einer der Nachteile solcher CC-Verknüpfungen ist die aufwendige Aufarbeitung zur Entfernung des entstandenen Eduktes Phosphinoxids. Ein weiteres Problem ist die Variation sowohl an der isosterischen Position als an anderen relevanten Position eines Peptidisosters limitiert.

2.4.4 C-Acylierung an der festen Phase

Die Übertragung der in Abschnitt 1.4 genannten Konzepte zur C-Acylierung zwecks der Synthese von biologisch relevanten Verbindungen an die feste Phase, stellt eine echte Herausforderung dar. In diesem Abschnitt wird eine Synthesemethode an der festen Phase, bei der die Variation der Bausteine aber auch die Aufarbeitung erleichtert wird, vorgestellt (Abb. 19). Dabei soll bei allen Syntheseschritten die Stereochemie erhalten bleiben.

Acyl(cyanomethylen)phosphoran-Methode

Die erste Übertragung der Acyl(cyanomethylen)phosphoran-Methode in Lösung (Abb. 18) an die feste Phase wurde in unserer Arbeitsgruppe erfolgreich etabliert (Abb 19).^[2] Bei dem entwickelten Festphasensynthesekonzept werden polymere (Cyanmethylen)phosphorane **41** über die normale WITTIG-Reaktion hinaus im Sinne eines Reaktivlinkers und 1,1-Dipol-Synthons verwendet. Im ersten Schritt wurde das polymere Phosphonium-Salz **40** über die Alkylierung vom polymergebundenen Triphenylphosphin mit Bromacetonitril erhalten. Anschließend erfolgte die Deprotonierung mit TEA zum polymergebundenen (Cyanomethylen)phosphoran **41**.

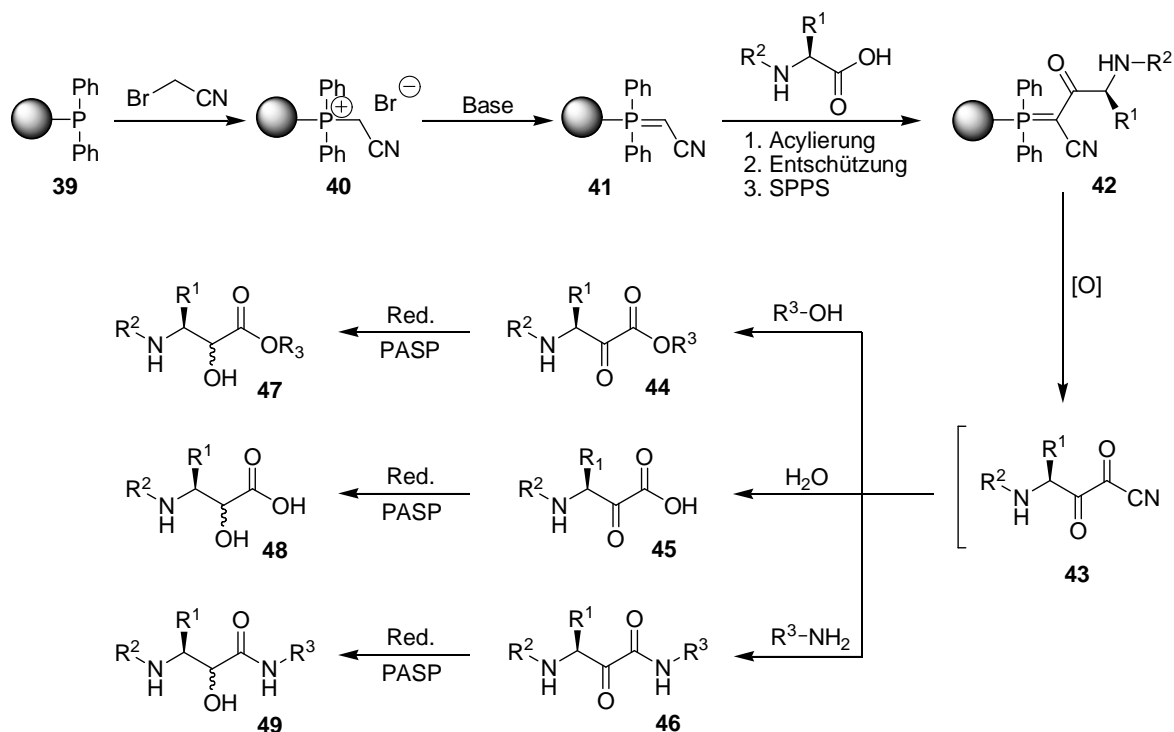


Abbildung 19: C-Acylierung am polymer-gebundenen Carbanionen-Äquivalent in unserer Forschungsgruppe etabliert.

Entscheidender Schritt des Synthesekonzeptes (Abb. 19) ist die sich anschließende C-Acylierung mit Fmoc-Aminosäuren und EDC/DMAP als Kupplungsreagenzien. Der letzte Schritt gab die Möglichkeit zur Variation des Restes R^1 am Reaktivlinker **41**. Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde die Variation des Restes R^2 über die Festphasenpeptidsynthese (SPPS) sehr leicht durchgeführt. Die oxidative Abspaltung mit DMDO führte zu Peptidyl- α,β -Diketonitril **43**, das mit verschiedenen Nucleophilen abreagieren kann. Die Reaktion mit Wasser in THF führte zu α -Ketosäuren **45**, die Reaktion mit Aminen unter Anwendung von Amin-Scavenger-Harz zur Entfernung von überschüssigen Aminen führte zu den α -Ketoamiden **46** und der Einsatz von Alkoholen führte zu Ketoester **44**. Die Reduktion aller Produkte führte zu den gewünschten Isosterstrukturelementen **47**, **48**, **49**, die in (Abb. 19) veranschaulicht werden. Die erfolgreiche Übertragung des (Cyanomethylen)phosphorankonzeptes an die feste Phase inspirierte, das Konzept der (Carboxylatmethyl)phosphorane ebenfalls an die feste Phase zu übertragen. Im Rahmen des Ergebnissteils wird sowohl das Konzept als auch die erzielten Strukturen und deren Anwendung ausführlich erörtert.

3 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit sollte ein diversitätsorientiertes Festphasensynthesekonzept entwickelt werden, welches die freie Variation der Substituenten in allen relevanten Positionen der zu synthetisierenden Peptidmimetika erlaubt.

Diese Dissertation beruht auf dem im Rahmen meiner Diplomarbeit entwickelten polymergebundenen Carbanionen-Äquivalent, das auf Carboxylatomethylen-phosphoranen basiert. Dieses Carbanionen-Äquivalent bietet einen effektiven Zugang zu milden C-Acylierungsreaktionen. Die Durchführung der milden C-Acylierung ist ein entscheidender Schritt für den Erfolg der gesamten Arbeit. Das etablierte Carbanionen-Äquivalent sollte zunächst den synthetischen Zugang zu Strukturen der C-terminalen Bis- und Tris-elektrophilen Peptiden wie z. B. Peptidyl- α,β -Diketoesters, Peptidyl- α -ketoaldehyde, und Peptidyl-Vinylketonen ermöglichen. Das Erreichen dieses Ziels eröffnet den Weg für zwei weitere Aufgaben. Die erste Aufgabe ist die Anwendung der zu synthetisierenden Peptidmimetika mit den entsprechenden Sequenzen als Inhibitoren gegen verschiedene Proteasen wie z. B. Caspase-3 und Sortase-transpeptidase. Die zweite Aufgabe bestand darin, sowohl die bis- als auch die tris-elektrophilen Strukturen in C-terminalen Peptidheterocyclen umzuwandeln. Die Peptidyl- α -ketoaldehyde sollten auch für die Synthese des als Cysteinproteaseinhibitor bekannten Diaminopropanol-Isoster über eine reduktive Aminierung an der festen Phase verwendet werden. Die Eignung dieses Synthesekonzeptes zur Synthese von weiteren biologisch relevanten Verbindungen wie Ceramiden, Peptidylketonen, -diketonen, und Diaminopentenonen ausgehend von Acylphosphoranen soll ebenfalls untersucht werden.

4 Polymer-unterstützte Carboxylatophosphoran-Ylide

4.1 Einleitung

Mit den Pionierarbeiten von G. Wittig auf dem Gebiet der Phosphorchemie und der Phosphorylide wurde ein neues Kapitel der Organophosphorchemie aufgeschlagen. WITTIG erkannte, dass Phosphonium-Salze **50**, die durch Alkylierung von Trialkylphosphinen mit Alkylhalogeniden erhalten werden, durch Umsetzung mit Methyllithium nicht zu Pentaalkylphosphoranen, sondern durch Abstraktion eines Protons unter Methan-Bildung zu Alkylidenphosphoranen reagieren, deren Struktur durch die mesomeren Grenzformeln **51** beschrieben wird.

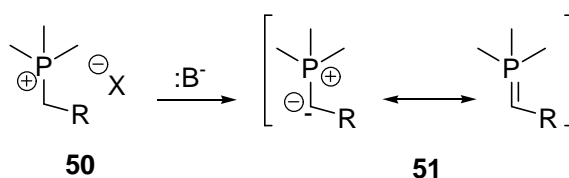


Abbildung 20: WITTIG-Ylide: Alkylidenphosphorane mit Phosphonium-Ylid-/Phosphor-Ylen-Grenzstrukturen **51**.

Trialkylide **51** sind wie andere Carbanionen feuchtigkeits- und luftempfindlich. Mit Wasser reagieren sie im Sinne der Umkehr des vorstehenden Gleichgewichts. Viele Synthesen von Alkenen, darunter auch zahlreiche Naturstoffe, beinhalten als Schlüsselschritt eine Wittig- oder verwandte Reaktion. Im industriellen Maßstab wird diese Reaktion beispielsweise bei der Synthese von Vitamin A angewandt. Erst in den 1970er-Jahre wurde mehrfach über polymere WITTIG-Ylide und ihre Umsetzung mit Aldehyden und Ketonen berichtet.^[62] Einer der Vorteile einer WITTIG-Reaktion mit polymergebundenen Yliden besteht in der Möglichkeit, durch einfache Filtration das entstandene, polymergebundene Phosphinoxid zu entfernen, was bei Durchführung in Lösung problematisch sein kann.^[63] Darüberhinaus findet das Triphenylphosphin-Harz Anwendung bei Wittig- und Mitsunobu-Reaktionen, bei der Darstellung von Alkylchloriden aus Alkoholen und als Ligand zur Komplexbildung von Übergangsmetallen. Neben der bekannten Verwendung von WITTIG-Yliden zur Carbonyl-Olefinierung zeigten mehrere Forschergruppen im Falle stabilisierter Ylide mit elektronenziehenden

Substituenten wie z. B. Carboxylat-Funktionen [(Carboxylatmethyl)phosphorane] die Möglichkeit einer Acylierung mit Säurechloriden.^[52]

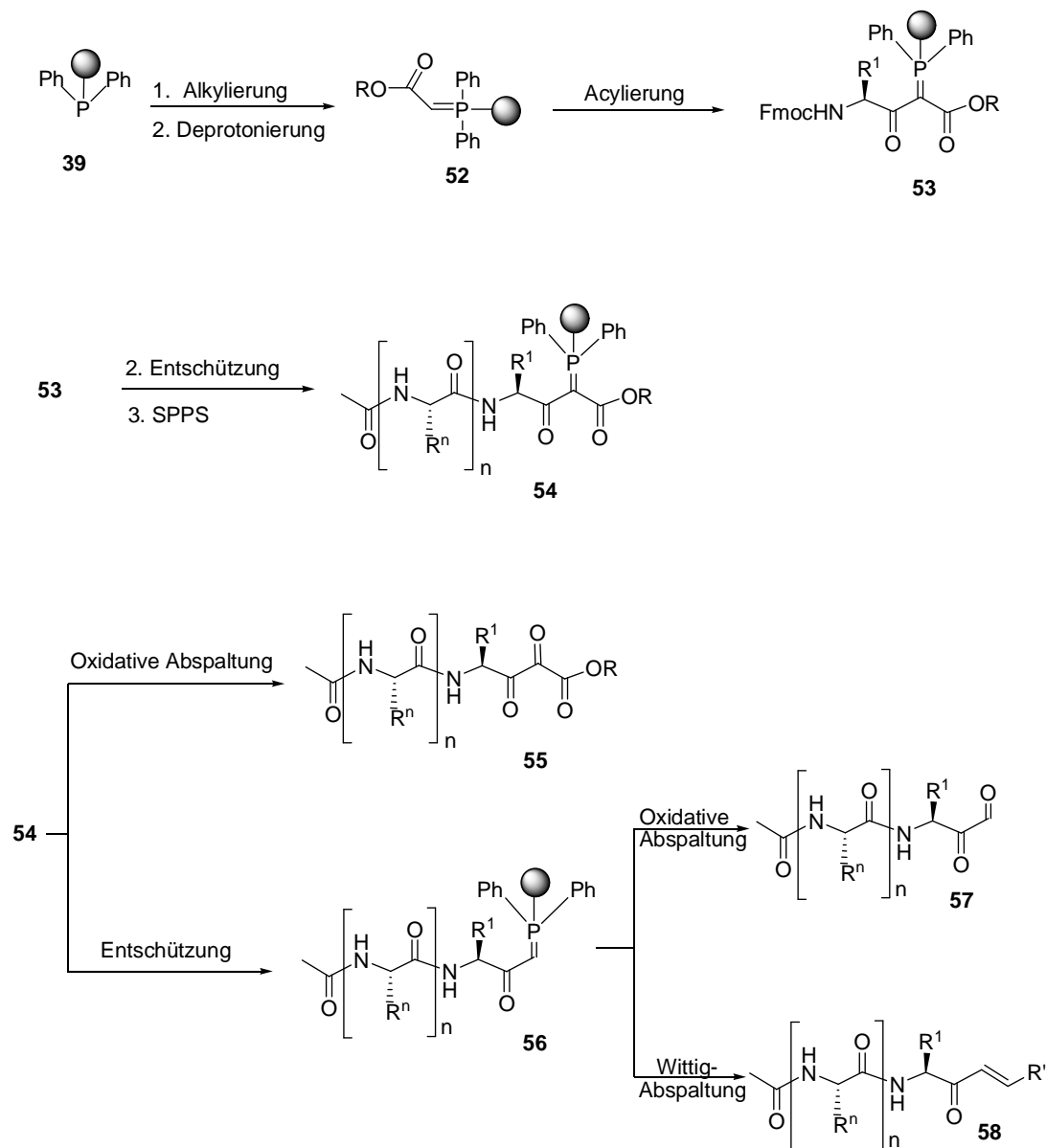


Abbildung 21: Festphasensynthese-Konzept basierend auf die(Carboxylatmethyl)phosphorane.

Aus Vorarbeiten in unserer Forschungsgruppe hat S. Weik die erfolgreiche Verwendung von Triphenylphosphin-Harz als Eduktharz zur Generierung von Cyanophosphoranen und deren Einsatz zur CC-Knüpfung bekannt.^[2] Ausgehend vom gleichen Eduktpolymer sollten die polymer unterstützten Carboxylatmethylphosphorane entwickelt und etabliert werden. Durch die neue Methode sollen neue Wege zur Synthese von Peptidmimetika

erschlossen werden. Die milde C-Acylierung sollte unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden, was entscheidend für die freie Variation ist. Die Variation der anderen Substituenten wird durch die anschließende Festphasenpeptidsynthese (SPPS) sehr leicht durchgeführt. Anschließend sollen verschiedene Abspaltungsbedingungen etabliert werden, welche zum Erhalt der gewünschten Strukturen wie Peptidyl-Diketoesters **55**, Peptidyl- α,β -ungesättigten Ketonen **58**, Peptidyl- α -ketoaldehyde **57**, Peptidyldiaminopentenone **104**, Peptidyldiketone **106**, Peptidylmethylketone **110**, **112** und *N*-acylierten Sphingosinen **93** führen. Ein weiterer Schritt bei dieser Arbeit ist die Synthese von Peptidyl-diaminopropanolen über die reduktive Aminierung von Peptidyl- α -Ketoaldehyden **57** mit einem festphasengebundenen Dipeptid **69**. In zahlreichen Literaturstellen (Kap. 1.2) wird berichtet, dass mit Heterozyklen-modifizierten Peptidmimetika auf Grund ihres Beitrags zur Einschränkung der freien Konformation zur Verbesserung der biologischen Aktivität im Vergleich zu ihren peptidischen Analogen führen können. Dies inspiriere uns zur Anwendung der Abspaltungsprodukte (Abb. 21) zur Herstellung von Heterocyclen-flankierten Peptidmimetika.

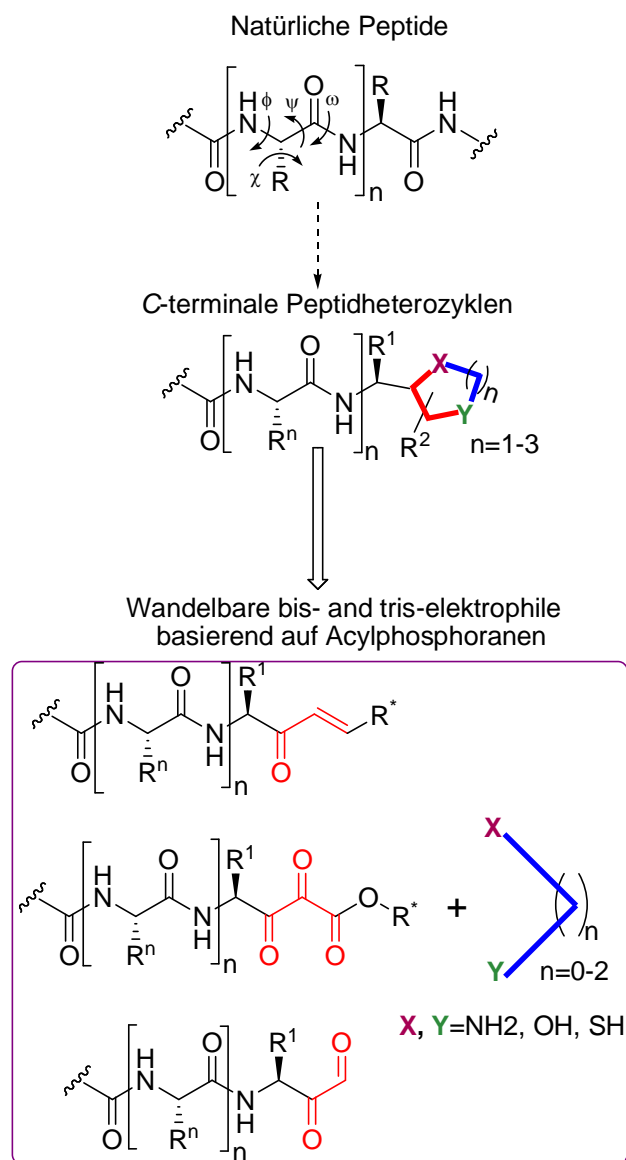


Abbildung 22: Synthetisierte Peptidylbis- und triselektrophile sind attraktive Edukte zur Synthese von Peptidylheterozyklen, die durch Reaktion mit Bisnucleophilen erhalten werden.

Die Modifizierung soll erst an synthetisierten Modellverbindungen untersucht werden, um zu zeigen, dass die metabolische Stabilität, biologische Aktivität, und Selektivität dieser Peptidmimetika ausgehend von unserem Konzept optimiert werden kann. Im Zusammenhang mit dem Aufbau solcher Peptidmimetika steht die Forderung nach der Entwicklung eines Konzeptes (Abb. 21), das in den folgenden Kapiteln ausführlich diskutiert wird.

4.2 Darstellung von 2'-trimethylsilyl-*N*-peptidyl-4-amino-3-oxo-2-phosphoranylidenbutylsäureester (**54**)

4.2.1 Alkylierung und anschließende Deprotonierung zum polymeren 2-Phosphoranyliden acetat (**52**)

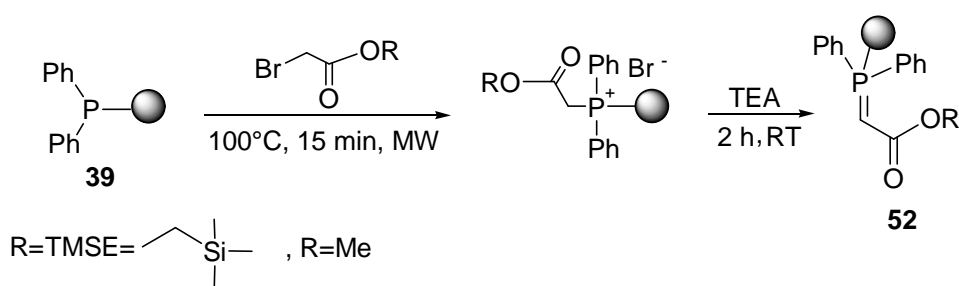


Abbildung 23: Alkylierung und anschließende Deprotonierung am Triphenylharz führt zum Polymergebundenen Linkerreagenz

Für das angestrebte Synthesekonzept wurde Triphenylphosphin-Harz **39** verwendet. Bei diesem Harz handelt es sich um ein diphenylphosphoniertes Copolymer aus Styrol und 1% Divinylbenzol. Dieses Harz ist kommerziell erhältlich und hat vom Hersteller eine Beladung von etwa 1.6 mmol/g und ist sehr gut quellbar in DCM und Toluol, was für die Synthese vorteilhaft ist. Etwas weniger quillt das Harz in DMF und THF. Vorarbeiten in unserer Forschungsgruppe zeigten ausgezeichnete Ergebnisse der Alkylierung in der Mikrowelle in einer Reaktionszeit von 15 min, die auch für unsere Alkylierung mit Bromessigester auch ausreichend war. Die Alkylierung wurde auch bei RT in einer Reaktionszeit von 48 erfolgreich durchgeführt. Der erste Schritt des angestrebten Synthesewegs bestand darin, die Alkylierung des Harzes mit Bromessigsäureester durchzuführen. Die Elementaranalyse auf Stickstoff und Brom ergibt eine quantitative Ausbeute. Ein Vergleich der aufgenommenen ATR-IR-Spektren vor und nach der Alkylierung zeigte neben der Ar-H und C-H-Valenzschwingung des Polystyrols zwischen 2851 cm^{-1} und 3056 cm^{-1} eine charakteristische Absorption bei 1735 cm^{-1} , die einer C=O-Valenzschwingung des Esters zuzuordnen ist (Abb. 24). Eine weitere starke Absorptionsbande einer C=O-Valenzschwingung ist bei 1110 cm^{-1} zu erkennen. Das hergestellte polymergebundene Phosphoniumsalz zeichnet sich durch hohe C-H-Acidität

aus und kann schon durch die verhältnismäßig schwache organische Basen Triethylamin^[64,65] oder DIEA^[66] leicht abstrahiert werden, wobei ein stabiles polymeres Wittig-Ylid entsteht. Die hohe C-H-Acidität des Wittigsalzes liegt im ziehenden induktiven Effekt der Carboxylatester-Gruppe und der Phosphoniumgruppe. Die Reaktion wurde mit ATR-IR-Spektroskopie untersucht. Es konnte kein Unterschied bei den Absorptionsbanden zum vorigen Schritt gefunden werden.

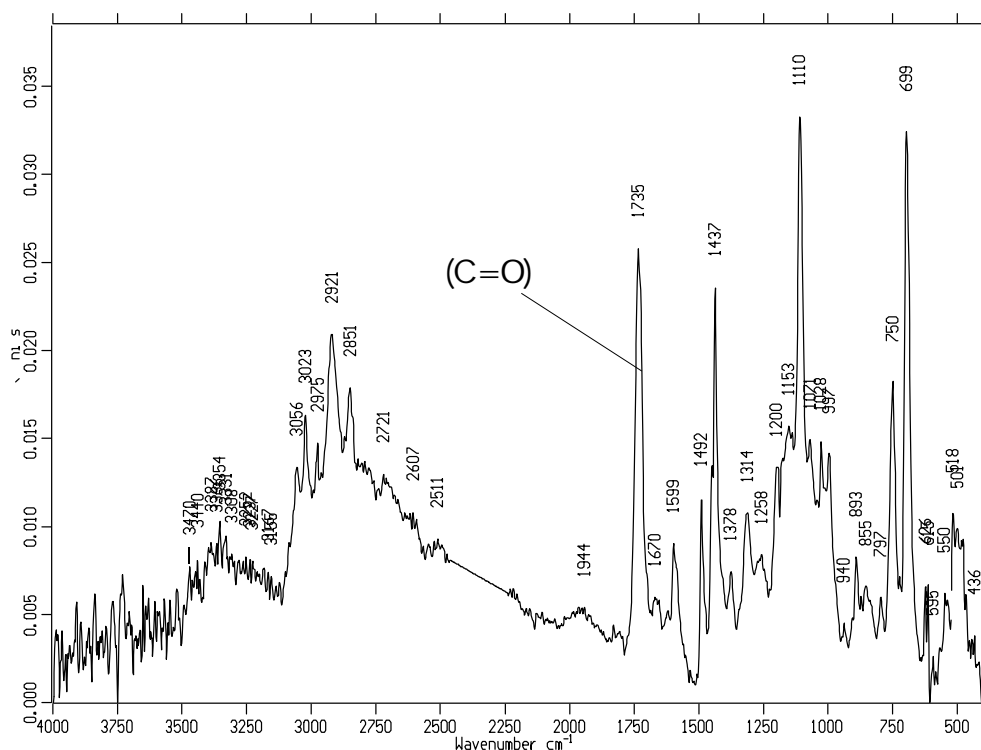


Abbildung 24: ATR-FT-IR von polymerem Triphenylphosphoniumbromid-Salz nach Alkylierung mit Bromessigsäuremethylester.

4.2.2 C-Acylierung des Phosphoranylidenacetat (**52**) zum 2-Acyl-2-phosphoranyliden acetat (**53**)

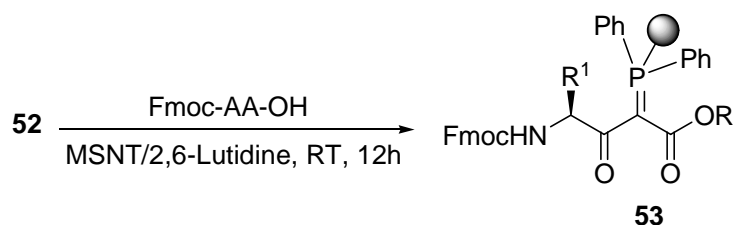


Abbildung 25: Acylierung von Fmoc-Aminosäuren auf Carboxylatophosphan mittels MSNT **61** als Aktivierungsmittel und 2,6-Lutidin als Base.

Aus der Lösungssynthese ist durch wenige Veröffentlichungen bei den dargestellten Carboxylatophosphanen die Möglichkeit bekannt, sie mit aktivierten Säurederivaten zu acylieren.^[67] An der festen Phase ist die Acylierung an den Carboxylatophosphanen bisher unbekannt.

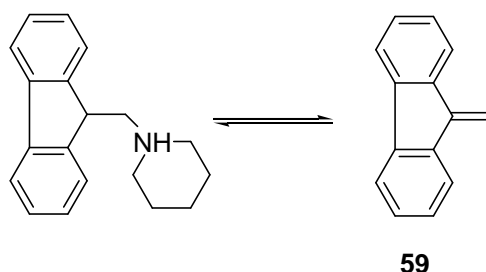


Abbildung 26: Piperidin-Dibenzofulven-Addukt: UV-photometrische Bestimmung der Konzentration zur Bestimmung der Kupplungsausbeute.

Zur Durchführung dieses Syntheseschrittes mit Fmoc-Aminosäuren wurden basierend auf eigener Vorarbeiten und analog zur Literatur zahlreiche Kupplungsreagenzien (Tab. 6) getestet.^[68,69] Die entsprechenden Kupplungsausbeuten wurden UV-photometrisch nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe bestimmt. Dabei wird die Konzentration des Piperidin-Dibenzofulven-Adduktes **59** (Abb. 26) über das Lambert-Beersche Gesetz bestimmt und auf die Kupplungsausbeute zurückgerechnet.

Tabelle 6: Variation der Kupplungsreagenzien und -bedingungen bei der Acylierung von polymerem Carboxylatophosphoran mit Fmoc-Phe-OH.

Eintrag	Kupplungsreagenzien	Lösungsmittel	Ausbeute *
1	EDC (5 eq), DMAP (0.75 eq)	DCM	46 %
2	HATU (5 eq), DIPEA (10 eq)	DCM/DMF (1:1)	33 %
3	BOP(5 eq), DIPEA(10 eq)	DMF	25 %
4	BTFFH (5 eq), DIPEA (10 eq)	DMF	85 %
5	BTC (1,65 eq), <i>sym</i> -Collidin (14 eq), DIPEA (14 eq), 50°C	THF	72 %
6	TFFH (5 eq), DIPEA (10 eq)	DMF	86 %
7	MSNT (5 eq), 2,6-Lutidin (4.5 eq)	DCM	86 %

* Fmoc-Bestimmung

Die erfolgreichste Acylierung gelang schließlich durch die Aktivierung mit TFFH als Säurefluorid (Tab. 6, Eintrag 4 und 6).^[70,71] Mit den Abkürzungen TFFH **60** und BTFFH werden zwei chemisch sehr ähnliche Reagenzien bezeichnet, das Fluor-N,N,N',N'-tetramethylformamidinium-hexafluorophosphat (TFFH) (Abb. 27), und das Fluor-N,N,N',N'-bis-(tetramethylen)-formamidinium-hexafluorophosphat (BTFFH). Sie unterscheiden sich nur in der Substitution der Stickstoffatome und führten bei der Aktivierung zu den gleichen Ergebnissen. Da das zuletzt aufgeführte TFFH **60** jedoch wesentlich billiger ist, wurde dieses für die meisten Versuche eingesetzt.

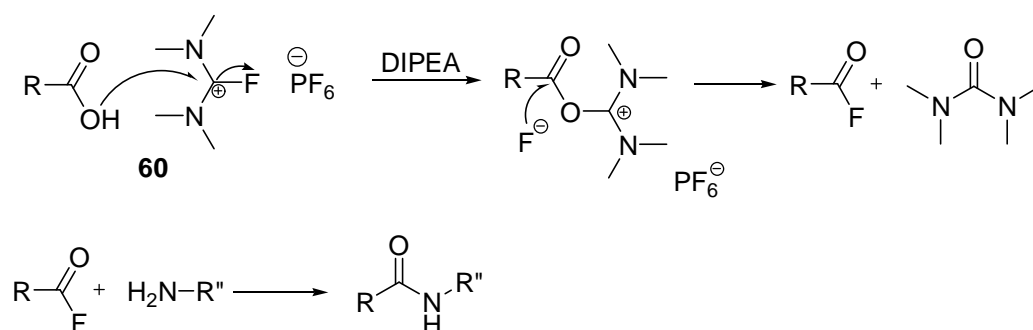


Abbildung 27: Reaktionsmechanismus der Aktivierung mit TFFH **60** zur Amidkupplung.

Um die verschiedenen in Abbildung 21 vorgestellten Reaktionsfolgen zu realisieren, deren Schlüsselschritt in einer Verseifung/Decarboxylierung der TMSE-Schutzgruppe liegt, musste bereits von Anfang an eine leicht und mild durchführbare Möglichkeit zur Verseifung angestrebt werden. Die kommerziell erhältlichen Bromessigsäuremethyl- bzw. *tert.*-Butylester erschienen dafür wenig geeignet. Methyl-ester muß stark basisch verseift, und *tert.*-Butylester stark sauer hydrolysiert werden, was zu Schwierigkeiten führt, wenn in den Peptidylphosphoranen **54** Aminosäuren mit Seitenkettenfunktionalität eingesetzt werden, die bei Anwendung der Fmoc-Strategie mit säurelabilen Schutzgruppen geschützt sind. Als Alternative erschien deshalb der Einsatz von Bromessigsäuretrimethylsilylethylester erfolgversprechend. Trimethylsilylethylester lässt sich sehr mild mit Fluoridionen unter Eliminierung von Ethen verseifen. In diesem Kontext zeichneten sich deshalb Probleme bei der Verwendung von TFFH, d.h. der Anwesenheit von Fluoridionen ab. Weitere Versuche und vorige Erkenntnisse an den parallel im Arbeitskreis bearbeiteten polymeren Cyanophosphoranen führten schließlich zur Aktivierung mit MSNT **61**. Es wurde der Einfluss verschiedener Basen wie *N*-Methylimidazol, DIPEA und 2,6-Lutidin auf die Kupplungsausbeute untersucht und letztlich 2,6-Lutidin weiterverwendet. An Cyanophosphoranen zeigte sich, dass Kupplungen unter diesen Bedingungen racemisierungsfrei ablaufen.

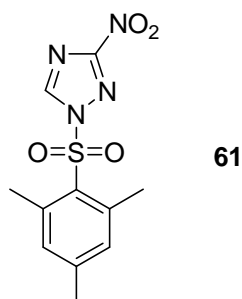


Abbildung 28: 1-(2-Mesitylenesulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol (MSNT) **61** ist ein mildes Acylierungsmittel.

Bisher war MSNT vor allem für Veresterungen^[72] und andere Acylierungen zusammen mit N-Methylimidazol eingesetzt worden.^[73] Die Kupplungsausbeute mit MSNT **61** reichte mit 86% (Eintrag 7) an diejenige mit TFFH **60** heran. Ein weiterer Vorteil der Aktivierung mit MSNT **61** und 2,6-Lutidin ist, dass Acylierungen ebenfalls auf Carboxylatophosphoranen racemisierungsfrei ablaufen. Neben Fmoc-Phenylalanin lieferten auch weitere getestete Aminosäuren sehr hohe Ausbeuten.

4.2.3 Festphasenpeptidsynthese am 2-acyl-2-Phosphoranylidenacetat (**53**) zu 2'-trimethylsilyl-N-peptidyl-4-amino-3-oxo-2-phosphoranyliden-butylsäureester (**54**)

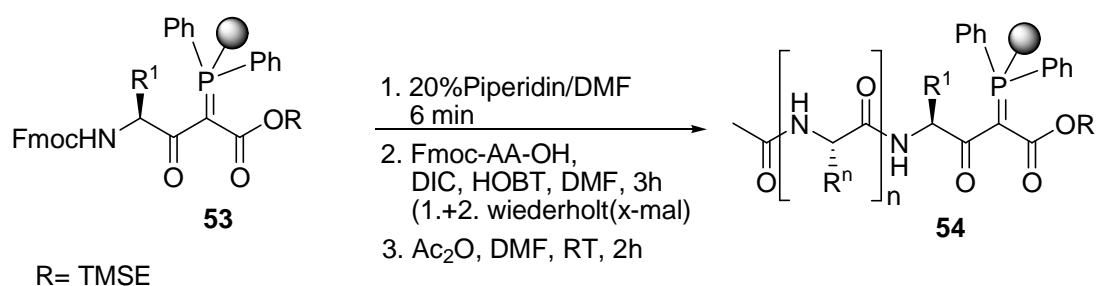


Abbildung 29: Fmoc-Abspaltung und anschließende SPPS.

Nach erfolgreicher C-Acylierung am Linker Reagenz **53**, bietet sich die Möglichkeit, ein Standard Festphasensynthese durchzuführen (Abb. 29). Für die Kupplung der Aminosäuren, um das Peptidylphosphoran **54** zu erhalten, wurde DIC/HOBT als Aktivierungsmittel verwendet. Zur nächsten Kupplung wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit

Piperidin/DMF (20%) abgespalten. Nach Kupplung der letzten Aminosäure und Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wird der N-Terminus in DMF mit Acetanhydrid und N-Ethyldiisopropylamin (8:1:1;v:v:v) acetyliert. Der Verlauf der Peptidsynthese wurde mit dem Kaiser-Test kontrolliert. Das ATR-IR-Spektrum zeigt nach der durchgeführten Peptidsynthese eine C=O-Absorptionsbande der Amidbindung bei 1664 cm^{-1} .

Bei 3390 cm^{-1} ist die Amid-N-H-Schwingung zu beobachten.

4.3 Synthese von Peptidyl- α -Ketoaldehyden (**57**), und deren Anwendung zu 1,3-Diaminopropanolen sowie Peptidyl-heterozyklen

Eine der Attraktivitäten von Peptidyl- α -Ketoaldehyden besteht darin, dass sie als potentielle Cystein- und Serinprotease-Inhibitoren auf Grund ihrer biselektrophilie um das zehnfache effektiver als die analogen Peptidaldehyde sind.^[74] Weitere große Bedeutung kommt den Peptidyl- α -Ketoaldehyden bei deren Anwendung als biselektrophile Bausteine zur Synthese von Peptidyldiaminopropanolen und Peptidyl-heterozyklen zu. Im Rahmen dieses Kapitels werden die Synthese und die Anwendung von verschiedenen Peptidyl- α -Ketoaldehyden diskutiert.

Die bisher bekannte Synthese von Peptidyl- α -Ketoaldehyden funktioniert über die Synthese des peptidischen Fragments **62** an der festen Phase. Der darauf folgende Schritt ist die Diazomethylierung der Carboxylgruppe des synthetisierten Peptides **63** über Nacht, dann erfolgt als letzter Schritt die Oxidation mit DMDO zum gewünschten Peptidyl- α -Ketoaldehyd **57**.^[75,76]

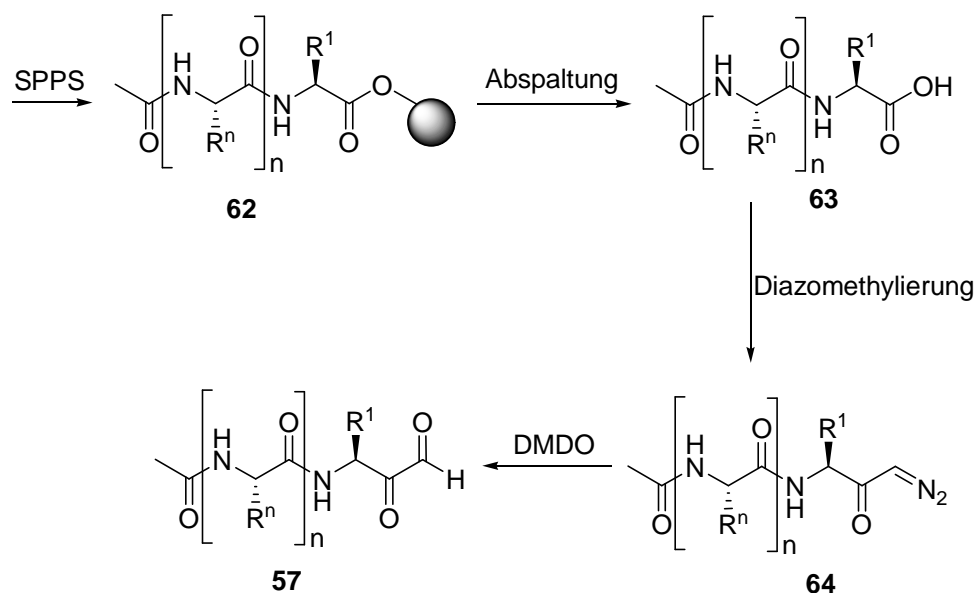


Abbildung 30: Synthese vom Peptidyl- α -Ketoaldehyd **57** nach H. Moncrieff.^[74-76]

Als Alternative sollte die Verwendung von polymergebundenen Phosphoranylidenacetaten zur Synthese von Peptidyl- α -Ketoaldehyden untersucht werden. Dazu musste eine Decarboxylierung von **54** etabliert werden. Das erfordert Esterschutzgruppe, die am Harz entschützt werden kann.

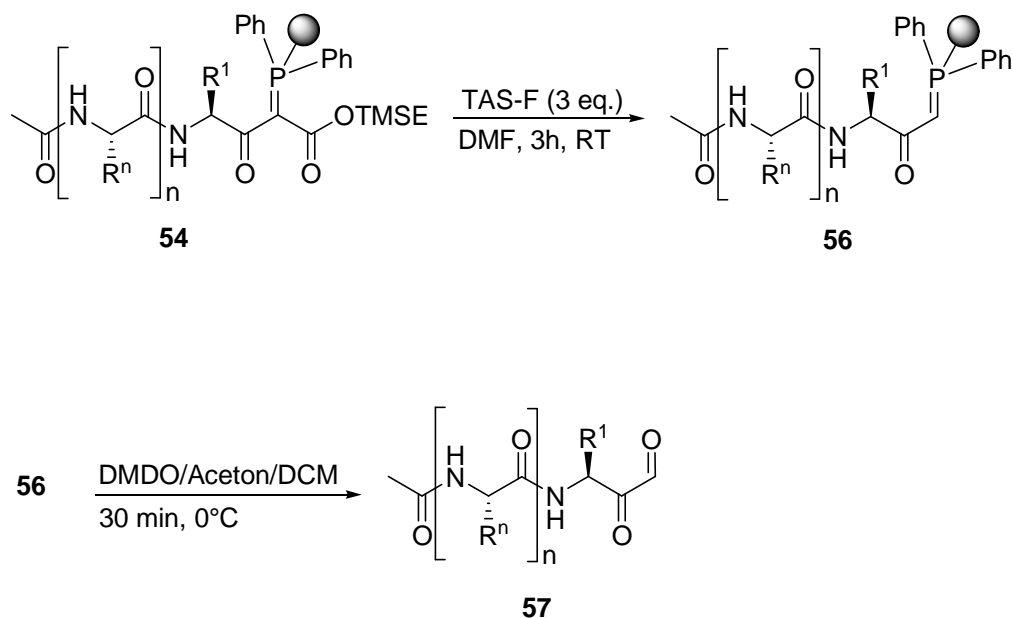


Abbildung 31: Milde Abspaltung der Schutzgruppe und anschließende Abspaltung zum Peptidyl- α -ketoaldehyd **57**.

Die Synthese von Verbindung **54** verlief analog Kap. 4.2.3, sodass die Alkylierung mit Bromessigsäure-trimethylsilyl-ethylester-Schutzgruppe statt mit Bromessigsäuremethylester unternommen wurde. Ein wichtiger Unterschied ist die Absorptionsbande der Si-C-Bindung bei 837 cm^{-1} , die nach der Alkylierung deutlich zu sehen ist (Abb. 32).

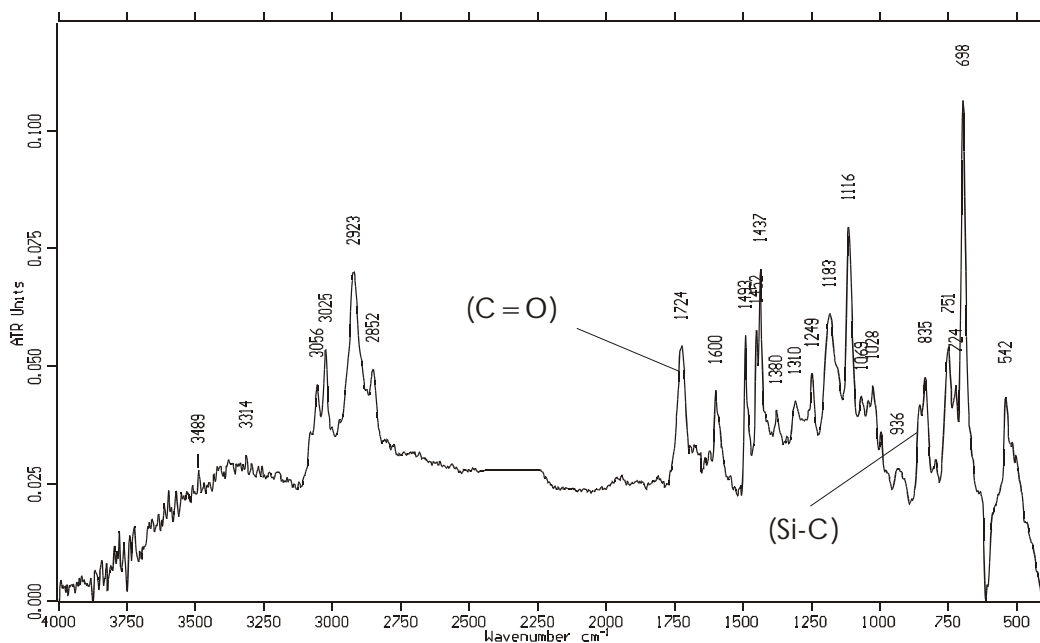


Abbildung 32: ATR-FT-IR-Spektrum von polymergebundenem Wittig-Salz nach der Alkylierung mit Bromessigsäure-TMSE-ester.

Nach Deprotonierung und Acylierung analog Kap. 4.2 mit einer Fmoc-Aminosäure erscheint im IR-Spektrum (Abb. 33) bei einer Wellenzahl von $742\text{--}760\text{ cm}^{-1}$ der Doppelpeak einer Ringdeformationsschwingung aus dem Aromaten der Fmoc-Schutzgruppe.

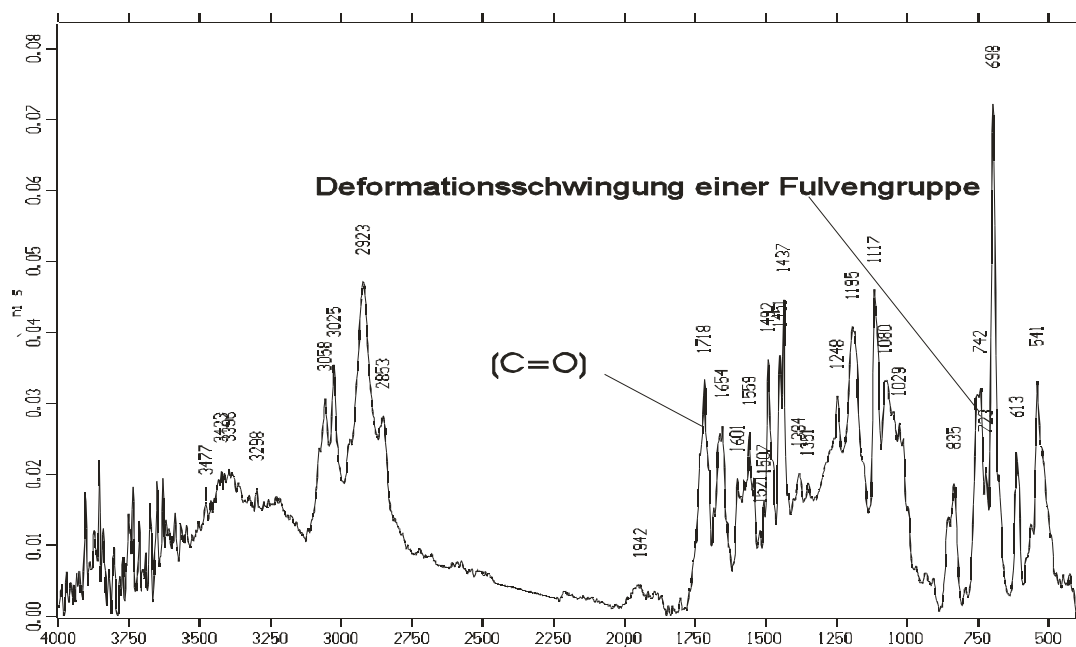


Abbildung 33: ATR-FT-IR-Spektrum nach Acylierung des TMSE-Carboxylatmethylenphosphoranharzes mit Fmoc-Phe-OH.

Abspaltung der TMSE-Schutzgruppe mit Tris(dimethylamino)schwefel difluoro-trimethylsilicat (TAS-F) zu Peptidyl-3-amino-2-oxo-1-phosphoranyliden propan (**56**)

Üblicherweise werden TMSE-Ester leicht mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) abgespalten. Die Verwendung von TBAF führte auch zur Spaltung des polymeren TMSE-esters. Diese Abspaltung lässt sich durch die Abwesenheit der Absorptionsbande bei 837 cm^{-1} (Schwingung einer Si-C-Bindung) im IR-Spektrum überprüfen. Nach oxidativer Abspaltung des Reaktionsproduktes mit DMDO konnte durch LC-MS-Analyse nachgewiesen werden, dass das erwartete Produkt **57**, ein Peptidyl- α -Ketoaldehyd, erhalten wurde. Im Anschluss an die Verseifung zu einer α -phosphoranyliden- β -ketosäure erfolgt also spontane Decarboxylierung zu Peptidyl-3-amino-2-oxo-1-phosphoranyliden propan **56**. Aus dem Chromatogramm ist auch ersichtlich, dass die Verseifung unter den gewählten Bedingungen unvollständig verlief. Als größtes Problem stellte sich jedoch die Anwesenheit von Tetrabutylammoniumionen in der Lösung heraus. Die Verwendung von Tetrabutylammoniumsalzen in Reaktionen an Polystyrolharzen hat den Nachteil, dass diese Salze nur sehr schwer bzw. nicht vollständig aus den Harzen herausgewaschen werden können. Im vorliegenden Fall blieben im Abspaltprodukt selbst nach gründlichem

Waschen vor der Abspaltung signifikante Mengen an Tetrabutylammoniumionen zurück, was durch NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grund wurde nach weiteren Alternativen zur TMSE-ester-Spaltung gesucht, darunter Pyridin/HF (Abspaltung bei -40°C , 24 h)^[77,78] und CsF/18-Krone-6 (Abspaltung bei 35°C , 35 h)^[79,80], die allerdings nicht zu befriedigenden Ergebnissen führten. Als sehr gut geeignet erwies sich schließlich Tris-(dimethylamino)-schwefel-trimethylsilyldifluorid (TAS-F) **65**, welches als sehr mildes neutrales Reagenz zur Abspaltung von Silylschutzgruppen verwendet wird.^[81] Umsetzung des 2-trimethylsilylethyl *N*-peptidyl-4-amino-3-oxo-2-phosphoranylidin butan **54** mit 5 eq. (TAS-F) in DMF für drei Stunden führte zu vollständiger Abspaltung und Decarboxylierung, die durch ein IR-Spektrum (Verschwinden der Si-C-Schwingung bei 837 cm^{-1} , Abb. 35) und LC-MS bestätigt werden konnte.

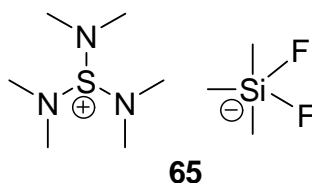


Abbildung 34: TAS-F ist ein effektives Reagenz zur Abspaltung der TMSE-Schutzgruppe.

Oxidative Abspaltung mit DMDO zum Peptidyl- α -Ketoaldehyd (**57**)

Nach TMSE-Esterverseifung und Decarboxylierung konnten vom Peptidyl-3-amino-2-oxo-1-phosphoranylidin propan **56** die entsprechenden Peptidyl- α -Ketoaldehyde oxidativ mit DMDO abgespalten werden. Die oxidative Abspaltung kann sowohl mit Ozon als auch mit Dimethyldioxiran erfolgen. Es ist bekannt, dass DMDO in Lösung selektiv und mit quantitativer Ausbeute aus Phosphoranen die entsprechenden Abspaltungsprodukte oxidativ freisetzen kann.^[82,83] Dimethyldioxiran lässt sich aus Aceton und Oxon herstellen und wird am besten vor einer Umsetzung frisch hergestellt.^[84]

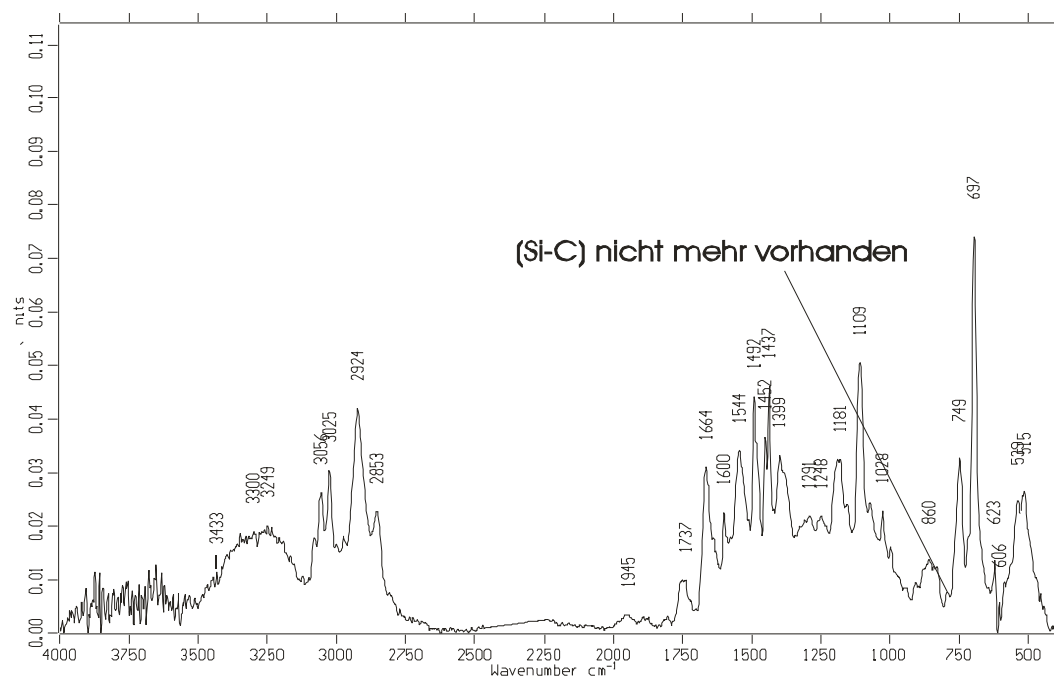


Abbildung 35: ATR-FT-IR für die Abspaltung der TMSE-Schutzgruppe mit TAS-F 65.

Die oxidative Abspaltung wurde unter neutralen Bedingungen bei 0°C durchgeführt, während die Abspaltung mit Ozon bei -78°C ablaufen muss ^[85,83], da es sonst zu zahlreichen Nebenprodukten kommen kann. Aus diesen Gründen haben wir uns für das DMDO entschieden. Die DMDO-Konzentration der Lösungen wird mit Hilfe von ¹H-NMR bestimmt, indem der Anteil der Umsetzung einer Thioanisol-Maßlösung zum entsprechenden Sulfoxid durch Integration der jeweiligen Phenyl-Protonen quantifiziert wurde. Für die erhaltenen DMDO-Lösungen in Aceton ergab sich dabei eine mittlere Konzentration von 0,072 mmol/ml. Charakteristisches Merkmal der Peptidyl- α -ketoaldehyde, dass sie breite UV-Signale im LC-MS-Chromatogramm zeigen (Abb. 37).

4.3.1.1 Synthese von Peptidyl-1,3-Diamino-2-hydroxy-propan (Peptidyl-1,3-Diaminopropanol) (**71**) ausgehend vom Peptidyl- α -Ketoaldehyd (**57**)

Weiterhin kommt den Peptidyl- α -Ketoaldehyden große Bedeutung bei der Synthese von Diaminopropanolisosteren zu, welche ein wichtiges Strukturmotiv von Inhibitoren der Aspartylproteasen sind.^[86,87] Peptidyl-1,3-Diaminopropanole **71** sind aus der Literatur als effektive HIV-Protease-Inhibitoren bekannt. Anhand der genetischen Informationen des

HI-Virus produzieren infizierte, menschliche Zellen Proteine, deren Bestandteile zum Aufbau neuer Viren dienen. Medikamente der Klasse der Protease-Inhibitoren wie Diaminopropanol mit der geeigneten peptidischen Erkennungssequenz verhindern, dass HIV-Protein-Scheren diese Vorstufen in funktionellen Stücken schneiden. So entstehen zwar weiterhin Viren, diese können jedoch keine neuen Zellen infizieren. ^[88,89] Für die Synthese von Hydroxylethylaminen müssen die Peptidyl- α -Ketoaldehyde mit Aminen, beispielsweise dem freien Aminoterminus eines harzgebundenen Peptids durch reduktive Aminierung und Reduktion der Ketogruppe umgesetzt werden. Durch Zugabe der Carbonylverbindung zum immobilisierten Amin bildet sich unter Abspaltung von Wasser in einem ersten Schritt ein Imin, welches anschließend zum entsprechenden Produkt reduziert werden kann. In dieser Arbeit geht es um die reduktive Aminierung der zwei hergestellten Peptidyl- α -Ketoaldehyde **66** und **67**.

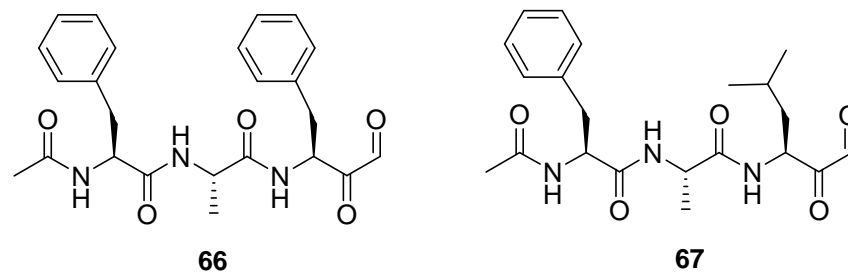


Abbildung 36: Peptidyl- α -Ketoaldehyde **66**, **67** als Ausgangsverbindungen für die Reduktive Aminierung.

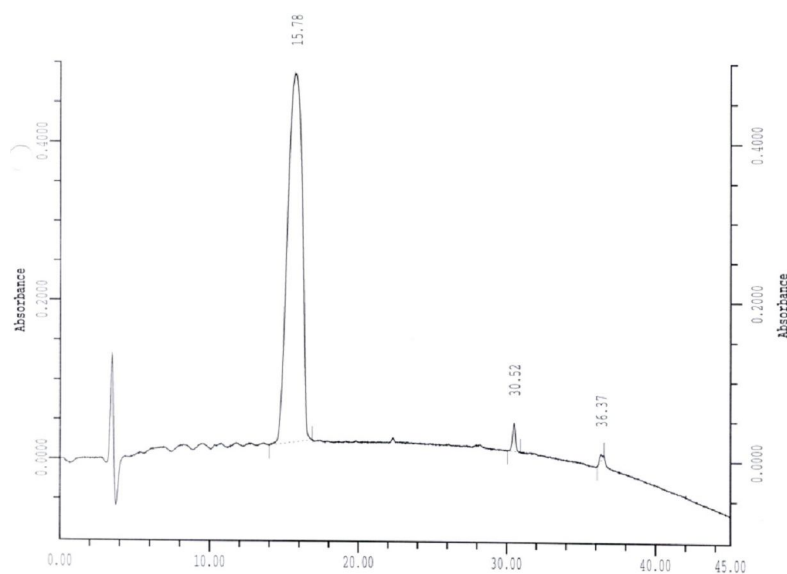


Abbildung 37: HPLC-Chromatogramm des hergestellten Peptidyl- α -Ketoaldehyd **67**.

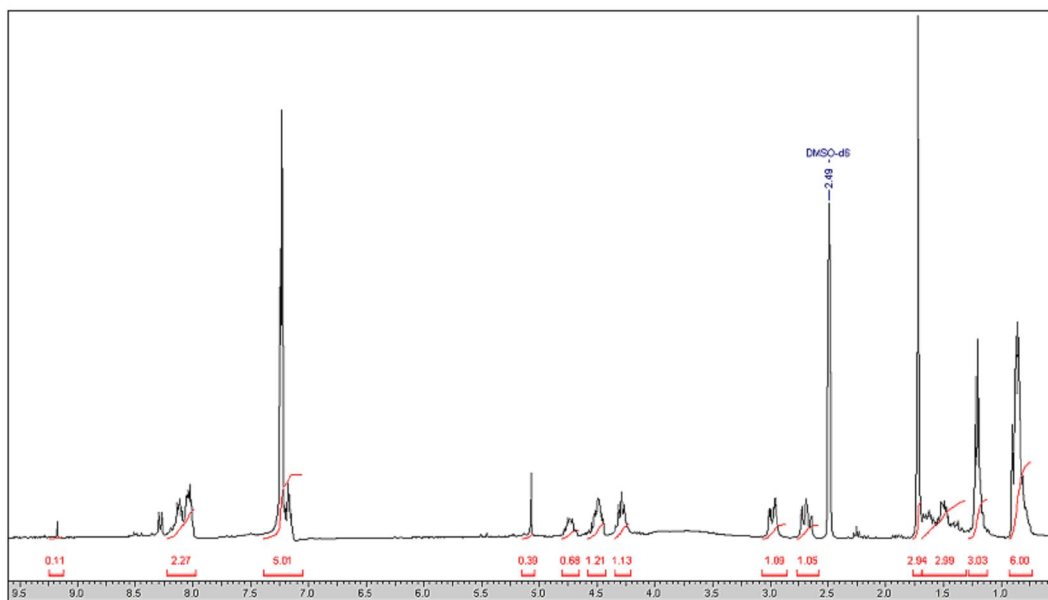


Abbildung 38: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz, DMSO-d_6) des Peptidyl- α -Ketoaldehyds **67**.

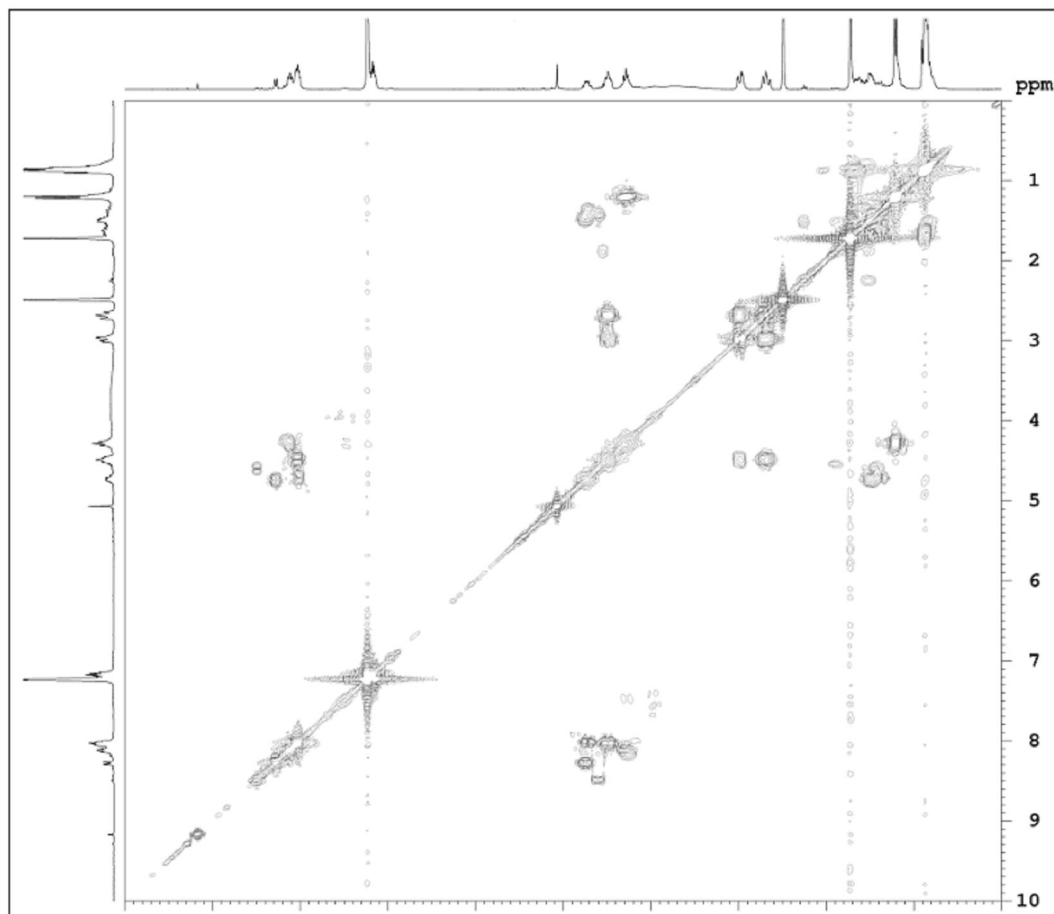
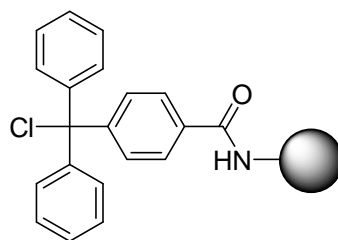


Abbildung 39: *H,H-Cosy-Spektrum (300 MHz, DMSO) des Peptidyl- α -Ketoaldehyd 67.*

In Testreaktionen wurde versucht, die entsprechende Umsetzung der Verbindungen **66** und **67** mit einem auf TCP-Harz **68** aufgebauten Dipeptid Leu-Ala **69** zu realisieren.



68

Abbildung 40: *Der TCP-Linker unterdrückt weitestgehend die Diketopiperazinbildung, die bei vielen anderen Linkersystemen ein Problem darstellen kann.*

Das TCP-Harz **68**, ein Polymer mit Trityllinker wurde deshalb gewählt (Abb. 40), weil bei Dipeptiden an der Esterbindung zum polymeren Träger unerwünschte Nebenreaktionen

auftreten können. Vor allem bei der basischen Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe könnte sonst es zu einem nucleophilen Angriff der freigesetzten Aminofunktion auf die an das Linkersystem gebundene Carboxyfunktion kommen und daraus die Bildung eines Diketopiperazins resultieren. Diese Nebenreaktion lässt sich sehr einfach durch Verwendung von sterisch anspruchsvollen Linkersystemen vorzugsweise von Trityllinkern **68** verhindern. Dieses Linkersystem hat darüber hinaus den Vorteil, dass vollgeschützte Peptidfragmente mit sehr schwachen Säuren wie beispielsweise Trifluoethanol oder Hexafluorisopropanol abgespalten werden können.

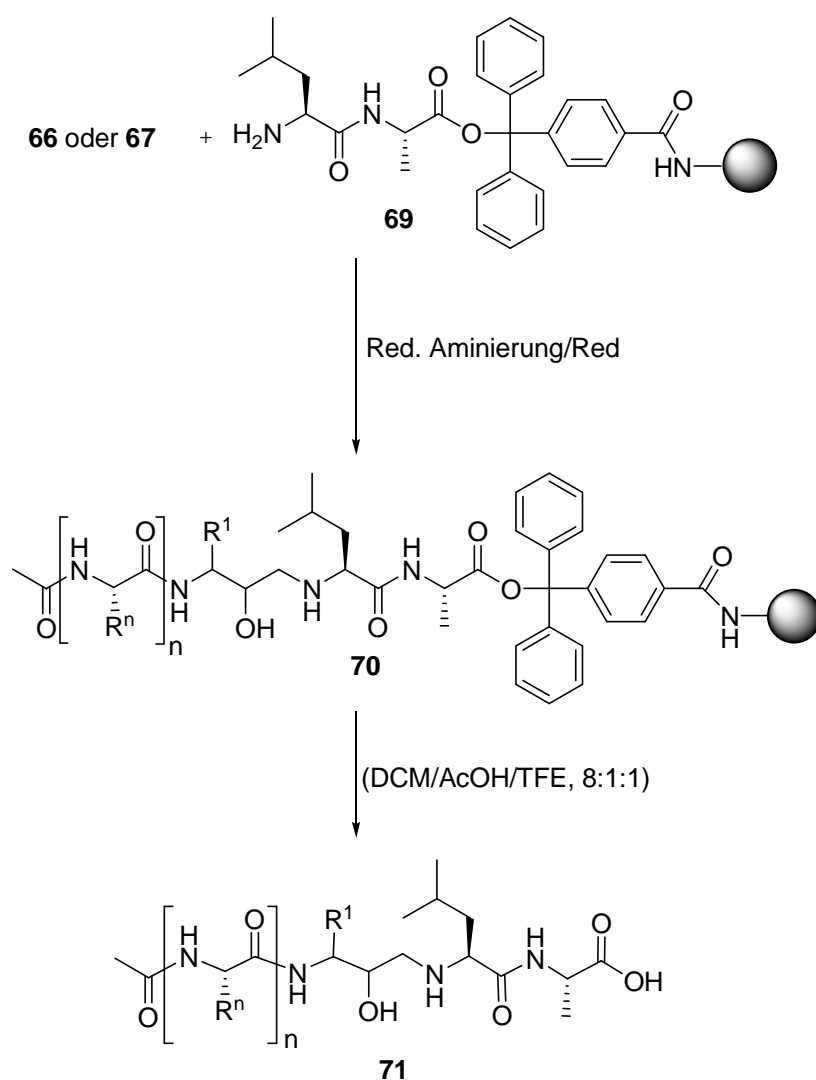
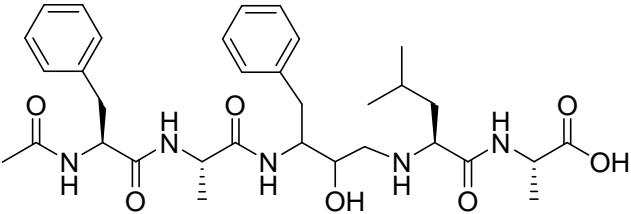
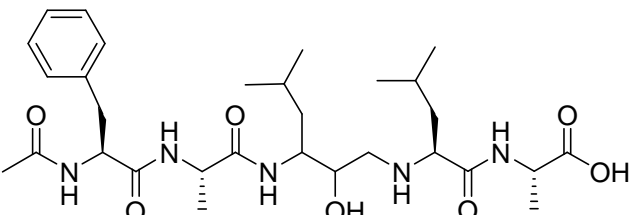


Abbildung 41: Konzept für die Synthese der Peptidyl-1,3-Diamino-propanole **71a** und **71b**.

Die reduktive Aminierung der Peptidyl- α -Ketoaldehyde **66** und **67** auf das polymere Dipeptid **69** und die anschließende Reduktion der Carbonylgruppe zum Peptidyl-

diaminopropanol **71** wurde folgendermaßen durchgeführt: Peptidyl- α -Ketoaldehyde **66**, **67** wurden separat unter Stickstoff in trockenem DMF/1% AcOH gelöst und zum harzgebundenen Peptid in zwei verschiedenen PP-Spritzen gegeben. Dabei sollte sich das entsprechende Imin bzw. das leichter reduzierbare Iminium-Ion bilden, welches mit NaCNBH_3 zum Amin reduziert wird. Nach fünf Stunden Reaktionszeit wurde NaBH_4 in Ethanol als weiteres, stärkeres Reduktionsmittel zugegeben, welches auch die Reduktion der Ketogruppe zum Alkohol ermöglichen sollte. Zur Abspaltung des Produktes vom Trityl-Harz wurde mit (DCM:AcOH:TFE, 8:1:1) behandelt und anschließend nach Evaporierung der restlichen Lösungsmittel mit dem präpertiven HPLC gereinigt.

Tabelle 7: Synthese von Peptidyl-1,3-Diamino-propanolen **71** aus Peptidylketoaldehyden und polymergebundenem Dipeptid **69** mittels reduktiver Aminierung.

Produkt	$[\text{M}+\text{H}]^+$	Reinheit ^[a]	Ausbeute ^[b]
 <p style="text-align: center;">71a</p>	626	>90 %	43 %
 <p style="text-align: center;">71b</p>	592	93 %	40 %

[a] Reinheiten des entstandenen Diastereomergemisches im Rohprodukt [b] Ausbeuten der chromatographisch isolierten Produkte.

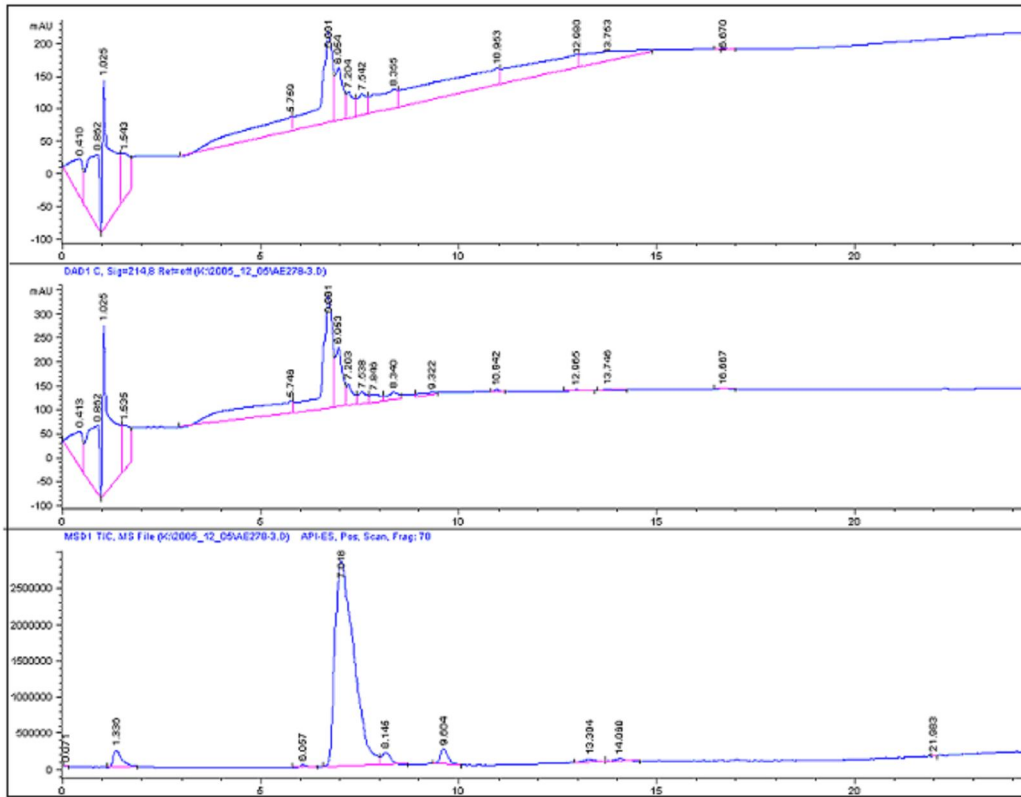
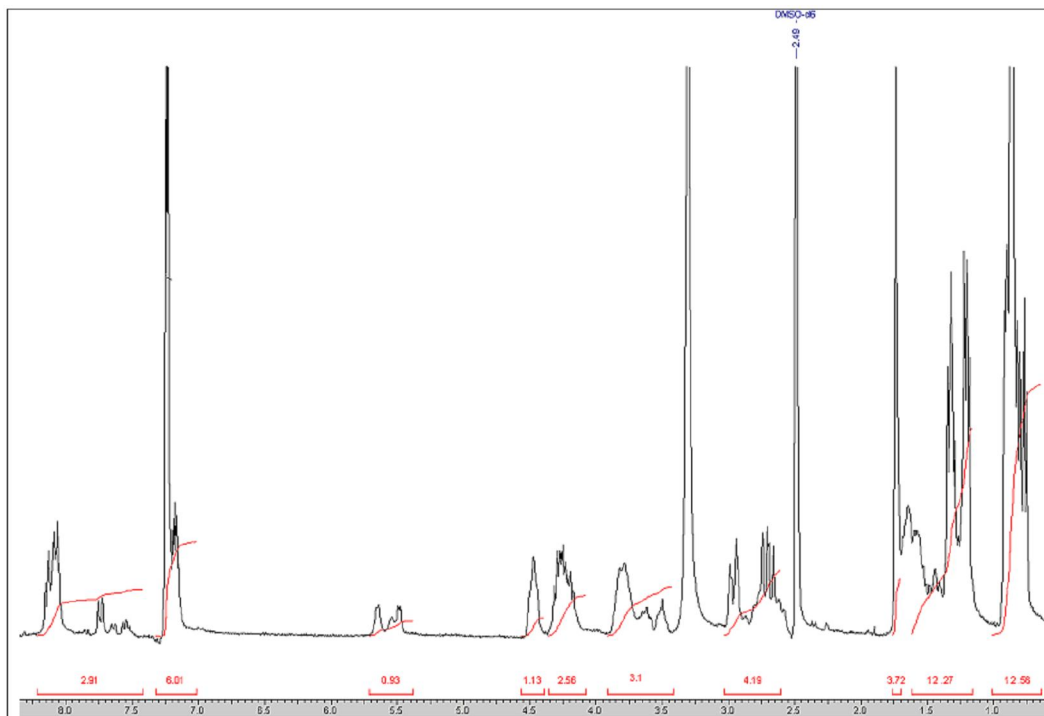


Abbildung 42: LC-MS-Chromatogramme der Verbindung **71b** nach chromatographischer Reinigung.



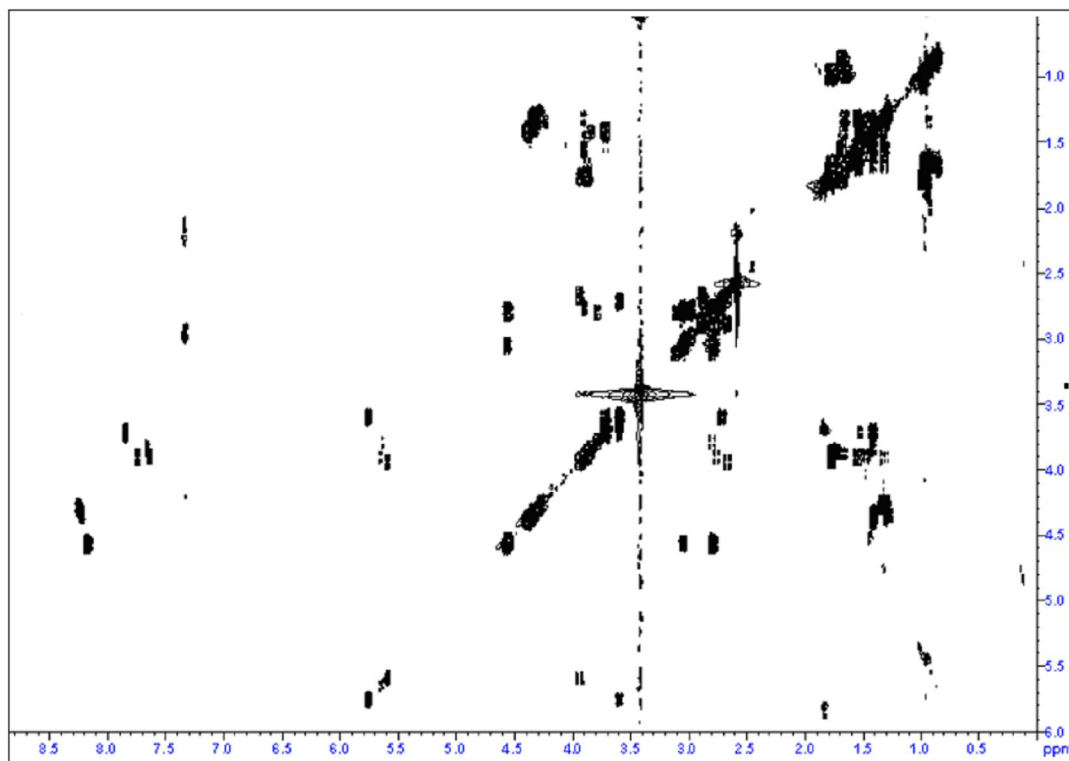


Abbildung 43: ^1H - und DQF-COSY-NMR (600 MHz, DMSO) von **71b** nach der chromatographischen Reinigung.

Das LC-MS-Chromatogramm bestätigt die Entstehung des Produktes reiner Form (über 90 % bei 220nm). Die Stereochemie wurde mit Hilfe der ^1H - und 2D-NMR-Spektroskopie aufgeklärt. Nach der Auswertung der DQF-COSY-NMR-Spektren konnte das Vorhandensein der vier Diastereomeren im gleichen Gemischverhältnis nachgewiesen werden.

4.3.1.2 Synthese von Peptid-Heterozyklen ausgehend von biselektrophilen Produkten

Eine wesentliche Aufgabe dieser Arbeit wie bereits in Abbildung 22 (Kap. 4) veranschaulicht wurde, ist die Möglichkeit der Umwandlung aller synthetisierten bis- und tris-elektrophilen Peptidmimetika am C-Terminus zu einigen Heterocyclen-flankierten Peptidmimetika zu testen. Dies wird an Hand von Beispielen in den folgenden Kapiteln präsentiert.

4.3.1.3 Synthese von Peptidyl-Chinoxalin (**72**)

Als erstes wurde versucht ausgehend vom Peptidyl- α -Ketoaldehyd **66** ein Peptidyl-Chinoxalin **72** zu synthetisieren. Zu diesem Zweck wurde das Peptidyl- α -Ketoaldehyd **66** hergestellt.

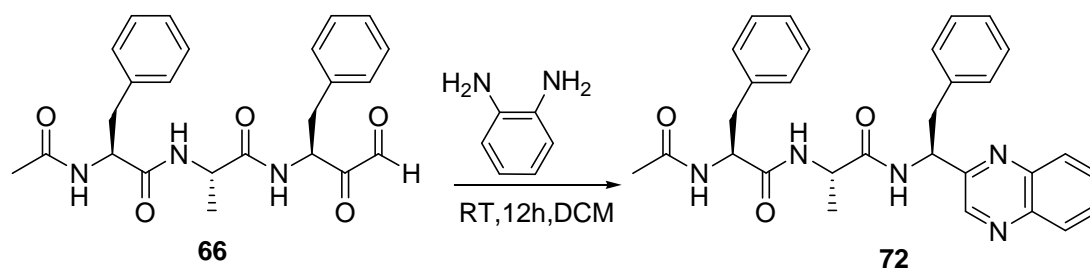


Abbildung 44: C-terminales Peptidyl-Chinoxalin ausgehend vom Peptidyl- α -Ketoaldehyd **66**.

Zum frisch vorbereitem Peptidyl- α -Ketoaldehyd, gelöst in trockenem DCM und über Molsieb, wurde das Phenyldiamin gegeben. Entgegen der in der Literatur-angegebenen Reaktionszeit (2h) unter Rückfluß verlief die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur.^[70] Mit der Durchführung der Reaktion bei Raumtemperatur sollte die Epimerisierung unterdrückt werden. Das überschüssige *o*-Phenyldiamin wurde chromatographisch aufgetrennt.

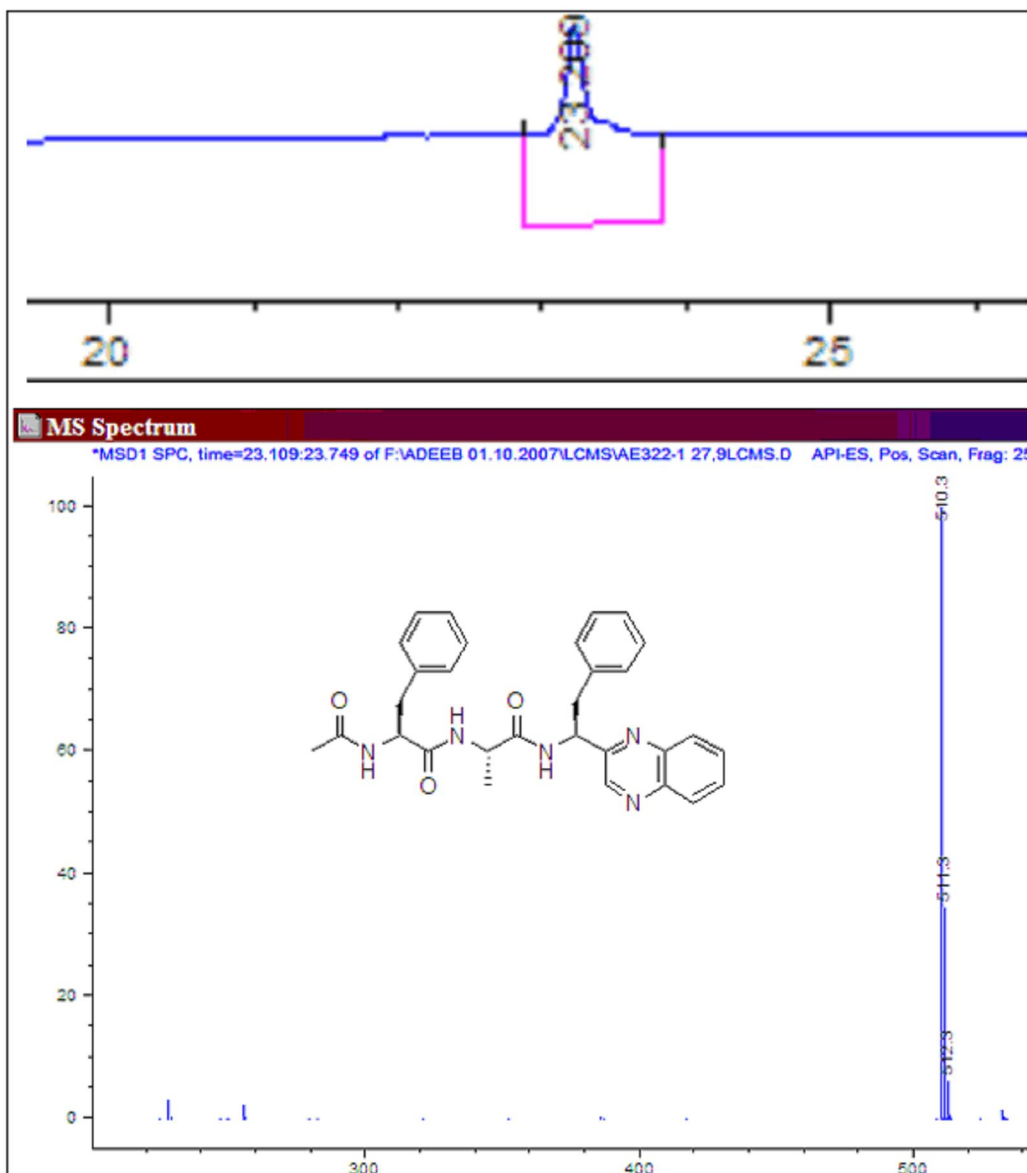


Abbildung 45: LC-MS-Analytik vom Peptidyl-Chinoxalin **72** ausgehend vom Peptidyl- α -Ketoaldehyd **66**.

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte, dass die Reaktion unter diesen milden Bedingungen razemisierungsfrei verlaufen ist. Das Produkt wurde quantitativ erhalten.

Im Laufe des Ergebnisse- und Diskussionsteils dieser Arbeit werden weitere Heterocyclensynthesen ausgehend von den etablierten Abspaltungsprodukten demonstriert.

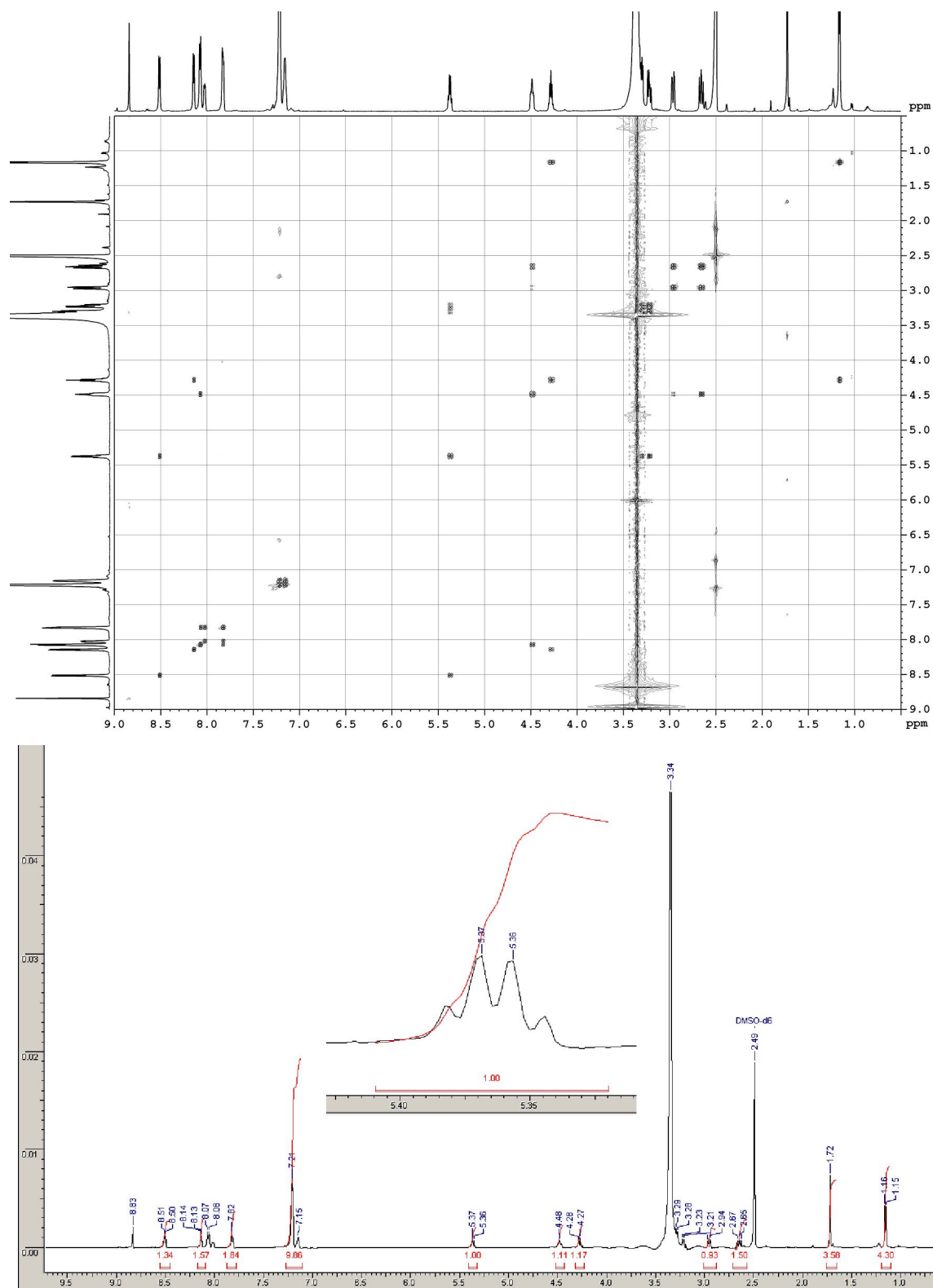


Abbildung 46: DQF-COSY-NMR und ¹H-NMR vom Produkt 72.

4.3.1.4 Synthese von Peptidyl- α -Ketoaldehyd mit Caspase-3-Erkennungssequenz (**73a**, **73b**)

Die Caspasen (Cystein Aspartate-specific Proteinases) bilden eine Familie aus asparaginsäurespezifischen proteolytischen Enzymen, deren Aktivierung auf ein proapoptotisches Signal hin erfolgt und zur Zerlegung einer Vielzahl zellulärer Proteine führt.^[90,91] In diesem Abschnitt wird die Anwendung des entwickelten Konzeptes zur Synthese von Caspase-3-Inhibitoren demonstriert. Als erstes Ziel sollte im Rahmen einer internen Zusammenarbeit ein Peptidyl- α -Ketoaldehyd **73a** mit der Erkennungssequenz der Caspase-3 Ac-DEVD hergestellt und in einem Fluoreszenz-basierenden Enzymassay getestet werden.

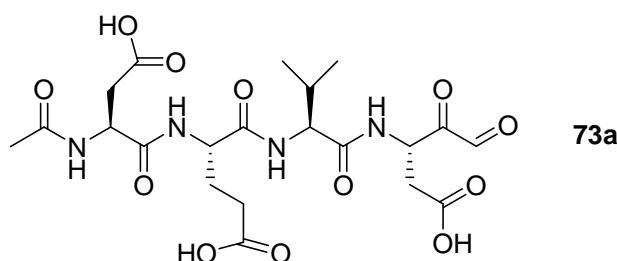


Abbildung 47: N-acetylierter Peptidyl- α -Ketoaldehyd mit der Caspase-3-Sequenz **73a**.

Dabei sollte der Effekt der zusätzlichen Carbonylgruppe des Ketoaldehyds im Vergleich zum bis jetzt bekannten Peptidylaldehyd-Inhibitor ($K_I=0.23$ nM) untersucht werden.^[92,93] Im Gegenteil zu unseren Erwartungen hat das Peptidyl- α -Ketoaldehyd **73a** weniger Inhibitionspotenz ($K_I=25$ nM) als der literaturbekannte Peptidylaldehyd. Ein weiteres Ziel der internen Zusammenarbeit war die Synthese vom Fluoreszenzmarkierten Peptidyl- α -Ketoaldehyd **73b** (**Fluos-DEVD-COCHO**) und dessen Anwendung als Sonde für eine zielgerichtete Identifizierung inhibitorischer Fragmente aus einer vorhandenen Bibliothek im (FMP).

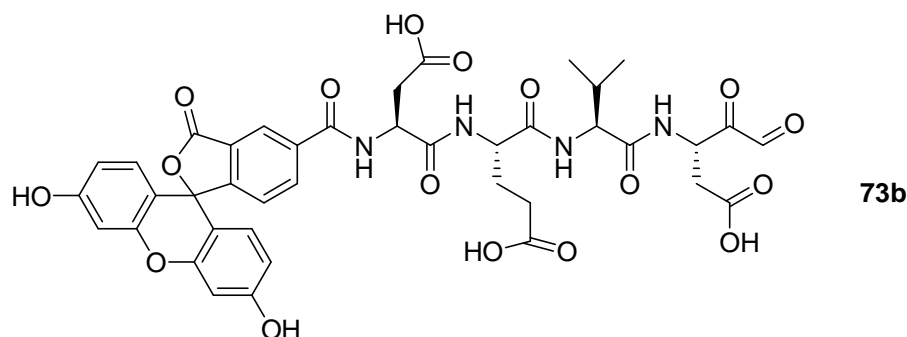


Abbildung 48: Fluoreszenzmarkiertes Peptidyl- α,β -Ketoaldehyds **73b** mit der Caspase 3 Sequenz.

Die Kombination des synthetisierten Ketoaldehyds mit einem Fragment aus der Bibliothek z. B. **74** über die Iminbildung resultierte ein neuer Inhibitor ($K_I=0.08$ nM), das sowohl besser als eins der beiden Fragmenten als auch das bis jetzt bekannte Inhibitor binden kann. Zur Bestätigung unseres Ergebnisses wurde der neu entstandene Inhibitor im Labor durch die reduktive Aminierung hergestellt, um ihn in einem fluoreszenz- basierendem Assay zu testen.

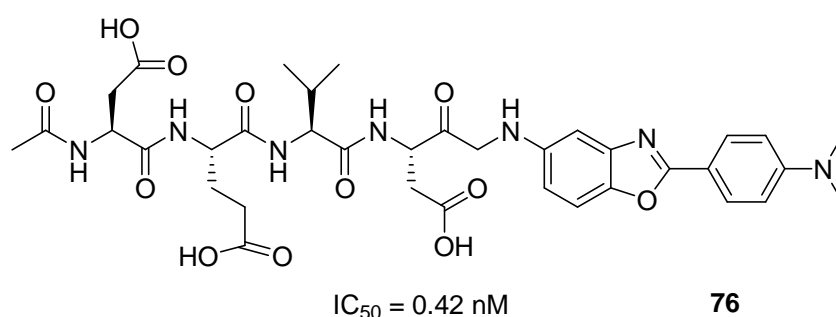


Abbildung 49: Caspase 3 Inhibitor, hergestellt über die reduktive Aminierung des Peptidyl- α -Ketoaldehyds mit dem aus der Substanzbibliothek gefundenen Fragment **74**.

Die reduktive Aminierung wurde in trockenem Lösungsmittel (DMF) unter Stickstoff und über Molsieb durchgeführt. Unter Anwendung des milden Reduktionsmittels Trichlorosilan wurde das entstandene Imin weiter zum Amin umgesetzt, ohne das Keton zum Alkohol zu reduzieren. Es ist wichtig, dass man das Reaktionsgefäß wegen der Flüchtigkeit des Trichlorosilans dicht verschließt. Analog wurde Inhibitor **77** aus dem Ketoaldehyd und Fragment **75** synthetisiert. Beim Testen des synthetisierten Inhibitors **77** wurden identische Inhibitionswerte erreicht.

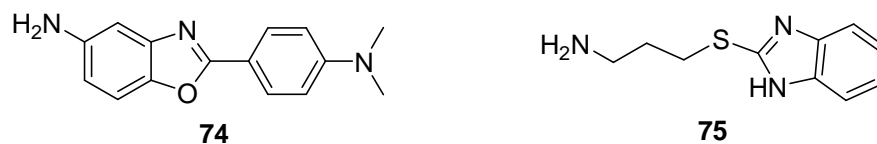


Abbildung 50: Fragmente aus der (FMP)-Bibliothek, die durch Iminbildung mit dem Ketoaldehyd **73b** zu einem besseren Inhibitor führten.

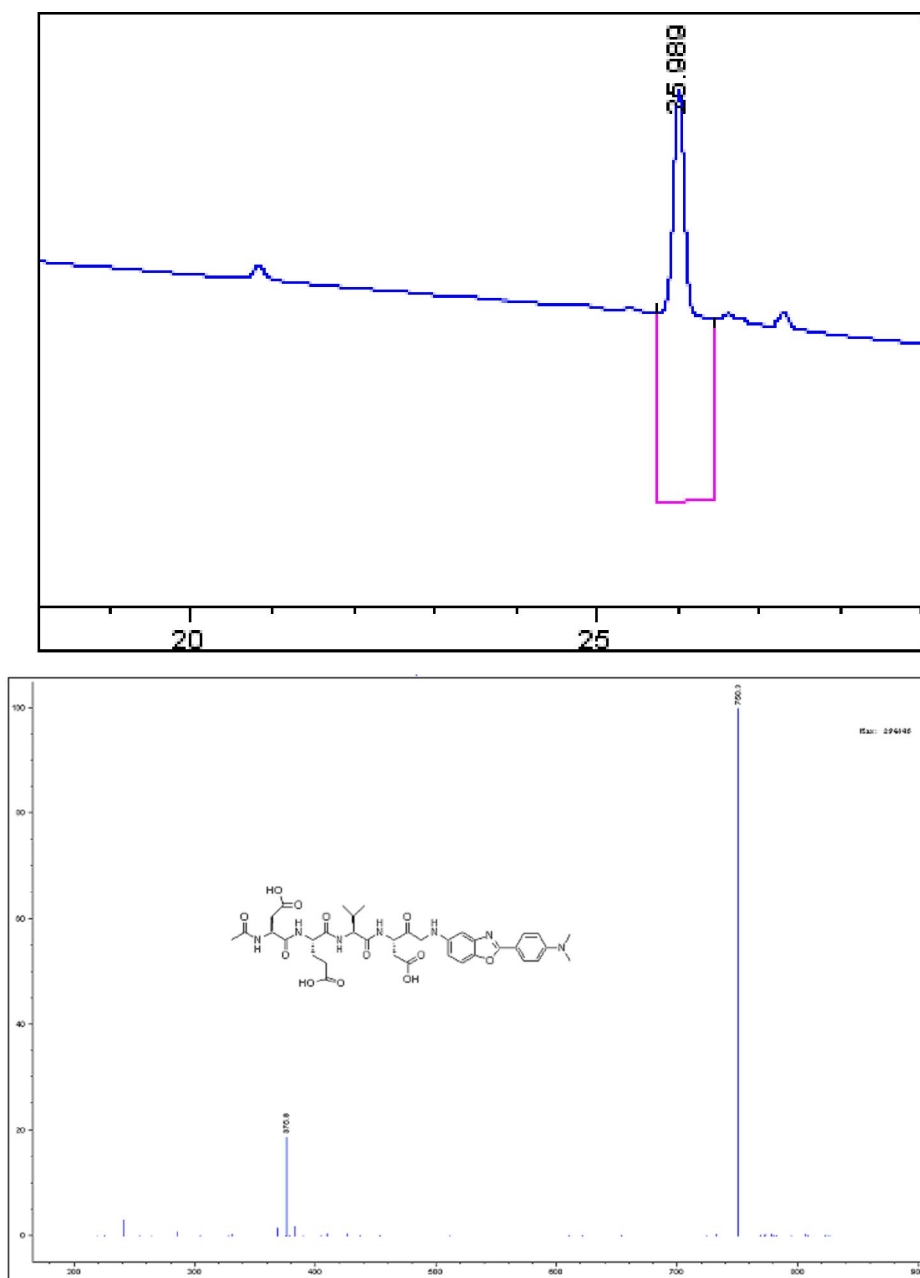


Abbildung 51: LC-MS-Chromatogramm (220nm) und Massenspektrum des Inhibitors **76** nach präparativer Aufreinigung.

Der Inhibitionseffekt von **77** war jedoch vergleichsweise unbefriedigend. Untersuchungen zu verschiedenen Inkubationszeiten in Wasser/Acetonitril deuten daraufhin, dass das synthetisierte Ligationsprodukt chemisch instabil ist.

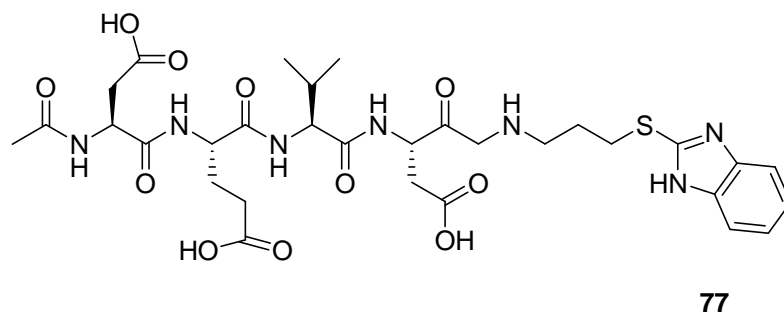


Abbildung 52: Caspase-3 Inhibitor, hergestellt über die reduktive Aminierung des Peptidyl- α -Ketoaldehyds mit dem aus der Substanzbibliothek gefundenen Fragment **75**.

Dies könnte den schlechten Inhibitionswert im Vergleich zum Ligationsprodukt (Iminprodukt) erklären.

4.3.1.5 Synthese von Peptidyl- α -Ketoaldehyden mit Sortase-Erkennungssequenz (**78**)

Sortase SrtA ist eine Cysteinprotease-Transpeptidase und kommt in Grampositiven Bakterien vor.^[94] Eine effektive Inhibition der SrtA führt dazu, dass wichtige Peptide nicht mehr über Transpeptidierung in die Zellwand eingebaut werden können.^[95,96] Dadurch kann das Wachstum dieser Bakterien, die infektiöse Erkrankungen verursachen und gegen fast alle Antibiotika resistent sind, gestoppt werden.^[97] Auf der Suche nach einem Übergangszustandsanalogon, welches als reversibler kompetitiver Inhibitor wirkt, wurde ein Phosphinopeptid gefunden, das jedoch nur schwache inhibitorische Aktivität besitzt.^[98] Es wurde bislang kein Kontrollversuch mit geänderter Aminosäuresequenz (*scrambled sequence*) durchgeführt, der die Spezifität des entsprechenden Inhibitors zeigen würde. Aufgrund der Tatsache, dass Ketoaldehyde potente Inhibitoren gegen Cysteinproteasen sind, wurde ausgehend von dem etablierten Synthesekonzept das **Ac-LPATCOCHO 78** mit der Sortase-Erkennungssequenz, und (**Ac-PLATCOCHO**) mit dem ausgetauschten Sequenz **79** synthetisiert.

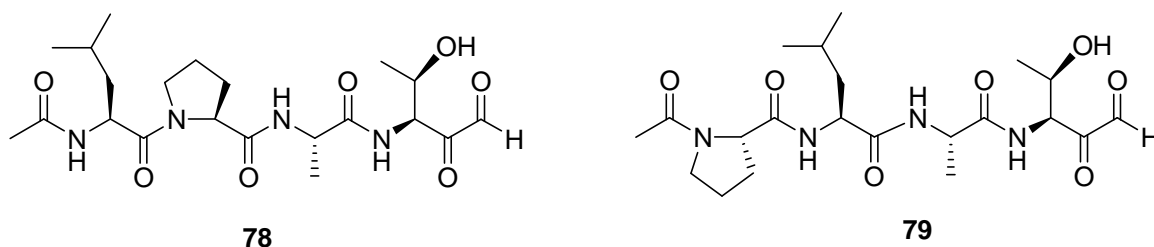


Abbildung 53: Peptidyl- α -Ketoaldehyd **78** mit der Sortaseerkennungsequenz, und mit der ausgetauschten Sequenz **79**.

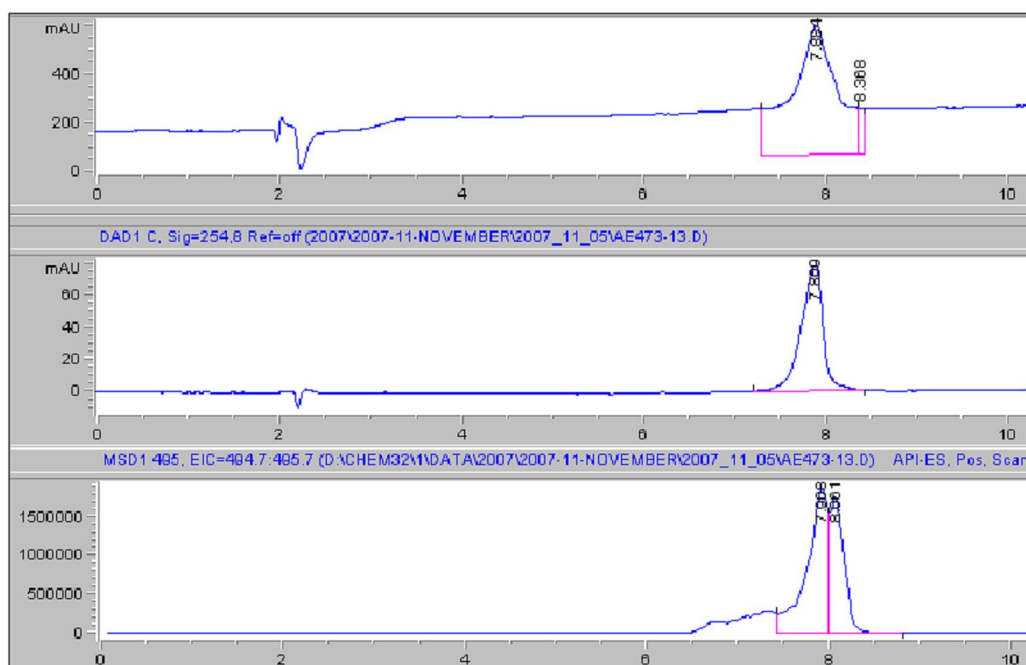


Abbildung 54: LC-MS-Chromatogramm vom chromatographisch gereinigten Peptidyl- α -Ketoaldehyd **79**.

Die synthetisierten Peptidisostere sollten im Rahmen einer Kooperation mit Stephan Pritz aus der AG Beyermann (FMP) in einem HPLC-basierten Assay getestet werden. Dabei wurde die Aktivität der Sortase in DMSO und Polyethylenglykol (PEG) in Gegenwart von Peptidyl- α -Ketoaldehyd-Inhibitoren **78** und **79** anhand der in Abbildung 55 gezeigten Reaktion bestimmt. Die Umsetzung des Dansyl-markierten Substrats 5g mit dem Nucleophil wird nach einer bestimmten Zeit abgestoppt und der Umsatz mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion aus den Peakflächen vom Produkt und Substrat berechnet. Die relative Aktivität ergibt sich aus dem Vergleich mit einer vorher festgelegten Standardreaktion. Durch den geringen Preis von Dansylchlorid im Vergleich zu den

entsprechenden Rhodamin- oder Fluoresceinderivaten, kostet dieser Ansatz deutlich weniger als die FRET-Methode.

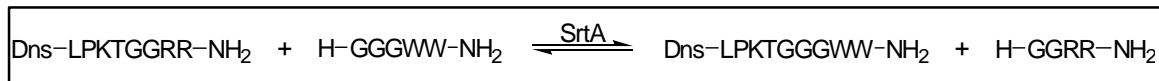


Abbildung 55: Reaktion für die Bestimmung der Aktivität von Sortase A.

In Abbildung 56 ist deutlich zu sehen, dass das Ketoaldehyd **79** mit dem ausgetauschten Sequenz zeigt anders als erwartet eine höhere Inhibition ($\text{IC}_{50} = 40 \pm 4$) $\mu\text{mol/l}$ als das Ketoaldehyd mit dem spezifischen Sequenz **78** ($\text{IC}_{50} = 211 \pm 21$) $\mu\text{mol/l}$.

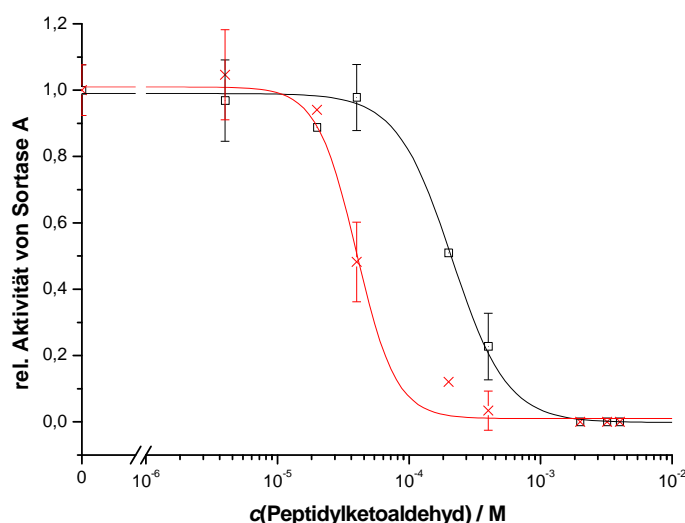


Abbildung 56: Relative Aktivität von Sortase A in Anwesenheit der Peptidyl- α -Ketoaldehyde **78** (schwarze Kästchen) und **79** (rote Kreuze).

Aus diesen Ergebnissen ist zu erkennen, dass das Ketoaldehyd des Peptidyl- α -Ketoaldehydes und nicht die Peptidsequenz direkt verantwortlich für die Inhibition ist. Weitere Ansätze zur Entwicklung besserer Inhibitoren könnten durch computerbasierte Methoden wie *Molecular Modelling* unterstützt werden.

4.4 Verwendung von Peptidyl-2,3-Diketoester **55** für die Heterozyklensynthese

4.4.1 Oxidative Abspaltung des Peptidyl-2,3-Diketoesters vom Harz

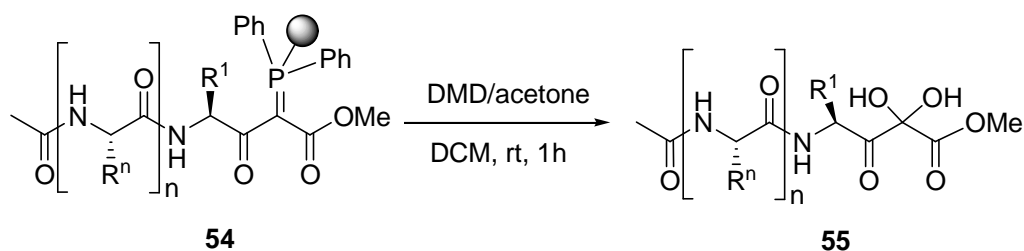


Abbildung 57: Konzept der oxidativen Abspaltung vom Peptidyl-Phosphoranylideneacetat **54** zum Peptidyl-2,3-Diketoester **55**.

Wir erkannten, dass auch die durch oxidative Abspaltung erhaltenen Peptidyl-2,3-Diketoester interessante Ausgangspunkte für die Kondensation zu Heterozyklen darstellen. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit drei Modellverbindungen **55a**, **55b**, **55c** synthetisiert,^[4] und ihre Umwandlung in Peptidheterozyklen untersucht. Im Unterschied zur oben beschriebenen Synthese wurde hier eine Methyl ester-Schutzgruppe eingeführt, die nicht abgespalten wurde. Der darauf folgende Schritt war dann die oxidative Abspaltung der Produkte vom Harz mit DMDO.^[82]

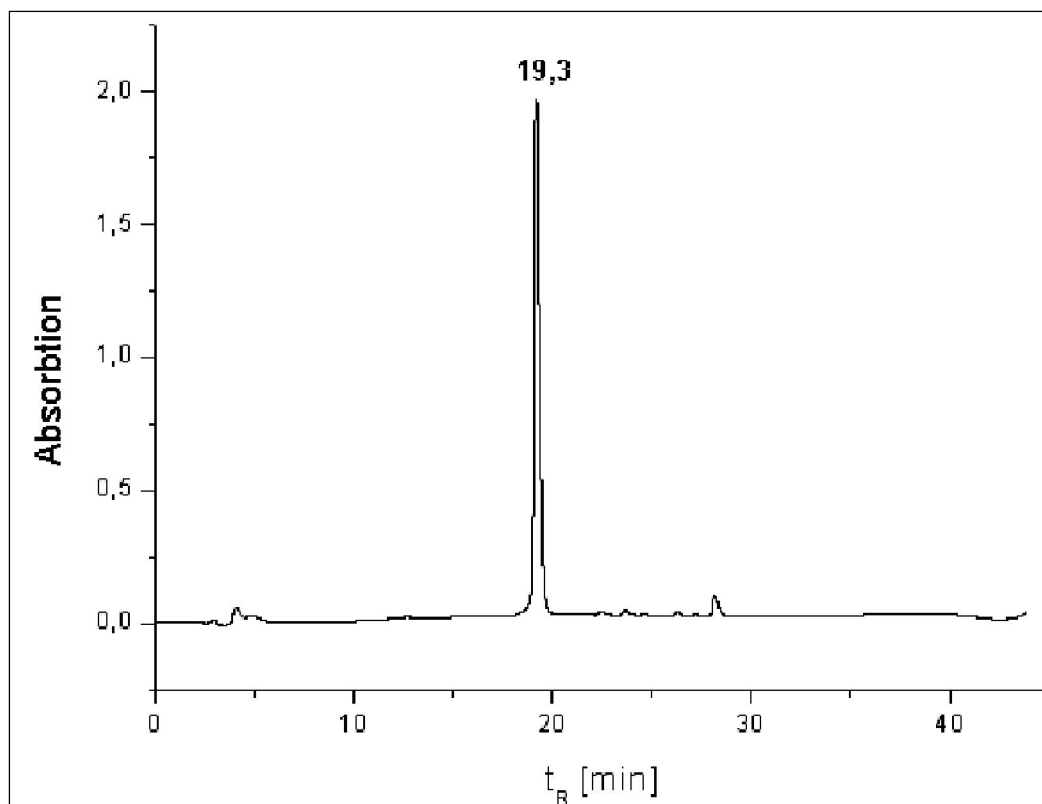
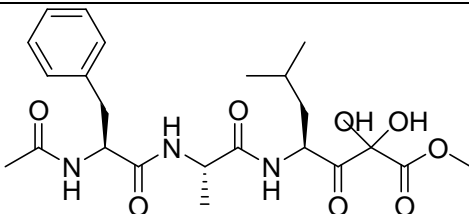
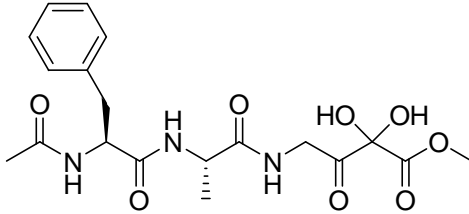
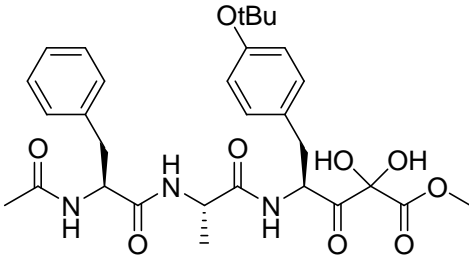


Abbildung 58: HPLC-Chromatogramm vom Peptidyl-2,3-Diketoester **55a**.

Durch LC-MS-Messungen wurde die starke Neigung der Verbindungen (Tab. 8) zur Hydratbildung nachgewiesen. Mittels der ¹H-NMR-Spektroskopie konnte bewiesen werden, dass die Synthese razemisierungsfrei verlief.

Tabelle 8: Peptidyl-2,3-Diketoester unterschiedlicher Sequenzen ausgehend vom etablierten Konzept in Abbildung 21.

Produkt	$[M+Na]^+$	Reinheit ^[a]	Ausbeute ^[b]
 <p>55a</p>	502 +H ₂ O	93%	77%
 <p>55b</p>	446 +H ₂ O	83 %	97 %
 <p>55c</p>	560	89 %	84 %

[a] Reinheiten von Rohprodukten, [b] Ausbeuten von den isolierten Produkten.

Um die Möglichkeit der Modifikation des Peptidyl-2,3-Diketoesters am C-Terminus zum Peptidylheterozyklus zu demonstrieren, wurde die Verbindung **55a** dafür verwendet.



Abbildung 59: C-Terminale Modifikation des Peptidyl-2,3-Diketoesters **55a** zum Peptidylphenylchinoxalin **81**.

Zum Peptidyl-2,3-Diketoester gelöst in trockenem EtOH wurde *o*-Phenyldiamin (1,2 eq.) gegeben und auf 80°C erhitzt. Bereits nach 3 Stunden konnte mit Hilfe der LC-MS Analytik die Vollständigkeit der Reaktion festgestellt werden.

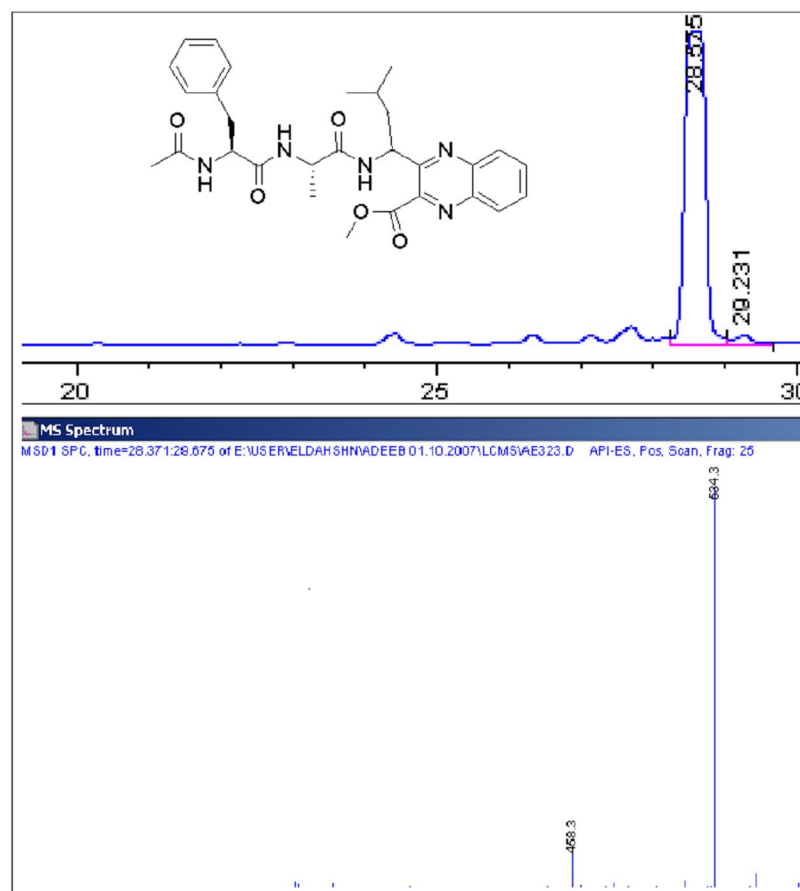


Abbildung 60: LC-MS-Analytik vom Rohprodukt **81**.

Das Produkt wurde chromatographisch gereinigt und in guter Ausbeute (64%) erhalten. Die NMR-Daten zeigen, dass das epimerisierte Produkt **81** entstanden ist.

4.5 Peptidyl-Vinylketone (**58**): Weiterer Zugang zu C-terminalen Peptidyl-Heterozyklen

4.5.1 Durchführung der Wittig-Reaktion am polymergebundenen Peptidyl-3-amino-2-oxo-1-phosphoranyliden propan (**56**)

Im Vorfeld hatten wir die Synthese von Peptidyl-3-amino-2-oxo-1-phosphoranyliden propan **56** etabliert. Diese Verbindung könnte einen generellen Zugang zu Peptidyl-Vinylketonen **58** bieten, den wir im Folgenden untersuchten.

4.5.2 Darstellung von Peptidyl-Vinylketonen

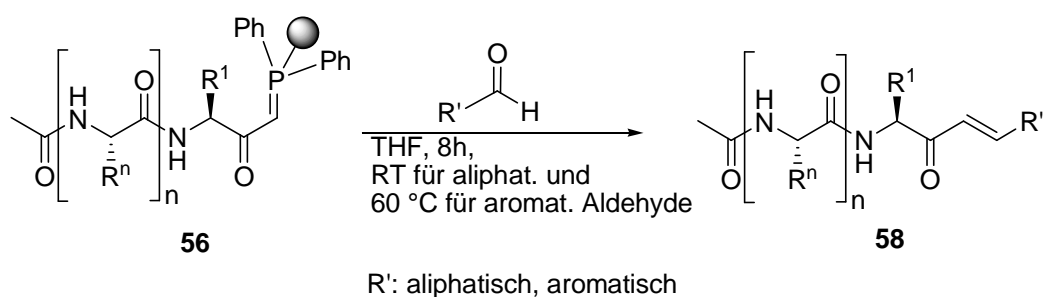
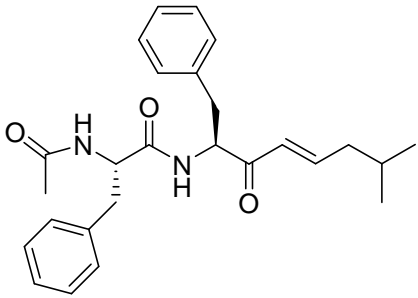
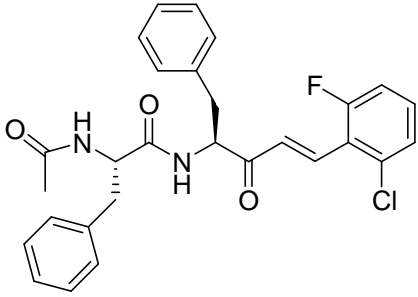
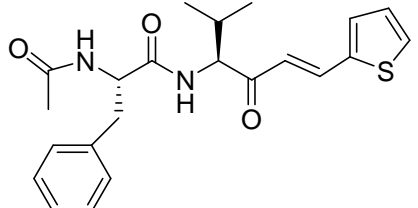


Abbildung 61: Peptidyl-Vinyl-Ketone **58** über die Wittig-Abspaltung.

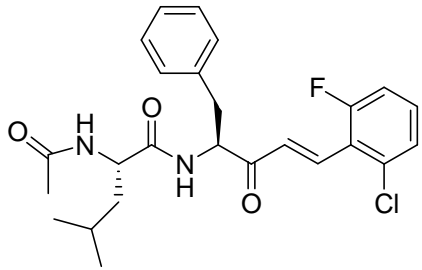
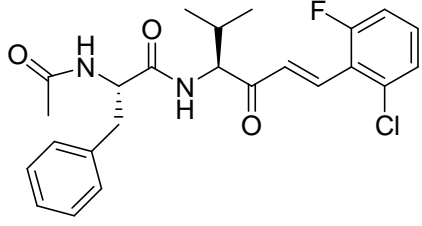
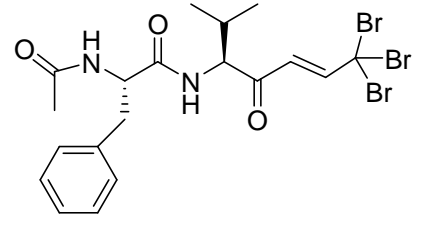
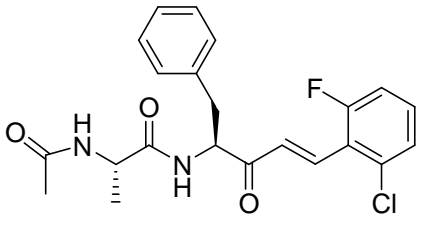
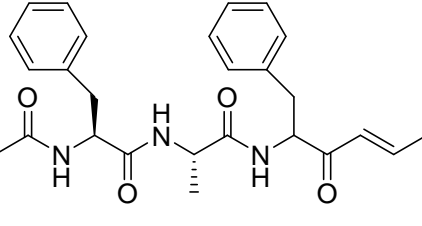
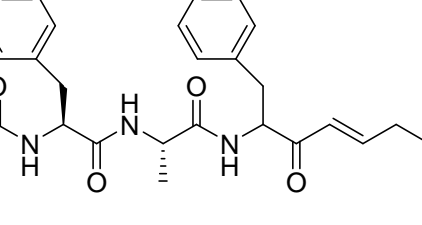
Die Peptidyl-Vinylketone vom Typ der Verbindung **58** wurden bereits vereinzelt als Serinprotease-Inhibitoren beschrieben.^[96] Diese Verbindungsklasse wurde bislang in mehrstufiger Synthese in Lösung hergestellt. Das bedeutet, dass die Variation der Reste in der Sequenz der erhaltenen Peptidisostere sehr begrenzt ist. Damit ist die Möglichkeit, die erhaltenen Peptidmimetika zu verändern, um eine bessere biologische Aktivität zu erreichen, sehr limitiert. Wir demonstrieren mit unserem Konzept (Abb. 21) die erste vollständige und milde Synthese von Peptidyl-Vinylketonen **58** an der festen Phase, die die Variationen in allen relevanten Positionen in der Peptidsequenz erlaubt. Darauf aufbauend wird im folgenden Kapitel 4.5.3 die Attraktivität der ungesättigten Verbindungen als gut geeignete Ausgangsstufen für die Synthese von Peptidheterozyklen dargestellt. Die Vorteile der Modifikation der Peptidyl-Vinylketone zu Peptidheterozyklen wurde im allgemeinen Teil (Kap. 1.3.1) und auch in Kapitel 4.1 ausführlich behandelt. Für die Synthese von

Peptidyl-Vinylketonen wurde zunächst das Peptidyl-3-amino-2-oxo-1-phosphosphoranylidenpropan **56** analog Kapitel 4.2 hergestellt. Als nächster Schritt wurde die Wittig-Abspaltung unter Anwendung von Aldehyden untersucht (Abb. 61). Die Wittig-Abspaltung mit aliphatischen Aldehyden wurde mit höheren Ausbeuten und Reinheiten unter Verwendung von DCM oder THF als Lösungsmittel bei Raumtemperatur durchgeführt. Mit anderen Lösungsmitteln wie DMF wurden geringere Ausbeuten erhalten. Der Grund ist vermutlich die bessere Quellbarkeit des Harzes in DCM bzw. THF. Nach 8 h war die Reaktion abgeschlossen. Längere Reaktionszeiten führten zu keiner Erhöhung der Ausbeute. Die Wittig-Abspaltung wurde auch in der MW untersucht. Die Reaktion verlief dort aber schlechter als unter den herkömmlichen Bedingungen (Abb. 61).

Tabelle 9: Synthetisierte Peptidyl-Vinylketone **58**.

Prod.	Struktur	Reinheit ^[a]	Ausbeute ^[b]
58a		80 %	68 %
58b		62 %	70 %
58c		85 %	65 %

Tab. 9: Fortsetzung

Prod.	Struktur	Reinheit ^[a]	Ausbeute ^[b]
58d		64 %	78 %
58e		61 %	74 %
58f		80 %	72 %
58g		83 %	90 %
58h		90 %	74 %
58i		80 %	71 %

[a] Reinheiten von Rohprodukten, [b] Ausbeuten von den isolierten Produkten.

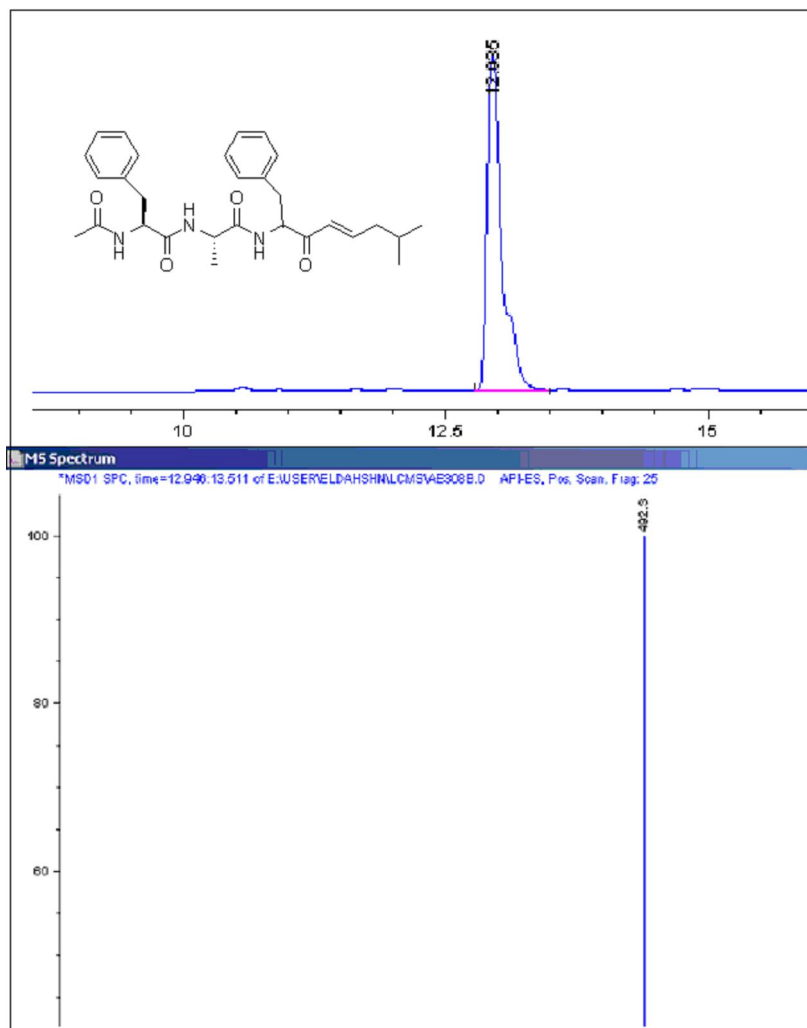


Abbildung 62: LC-MS von einem der synthetisierten Peptidyl-Vinylketonen **58i**.

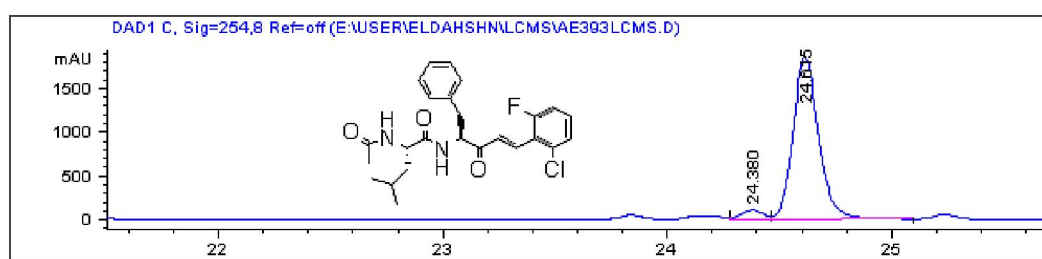


Abbildung 63: LC-MS-Chromatogramm von einem weiteren der synthetisierten Peptidyl-Vinylketon **58d**.

Die LC-MS-Analytik beweist, dass die meisten hergestellten Peptidyl-Vinylketone **58a-58i** bereits in Rohprodukt in zumeist guten Reinheiten erhalten worden sind (siehe Tab.9).

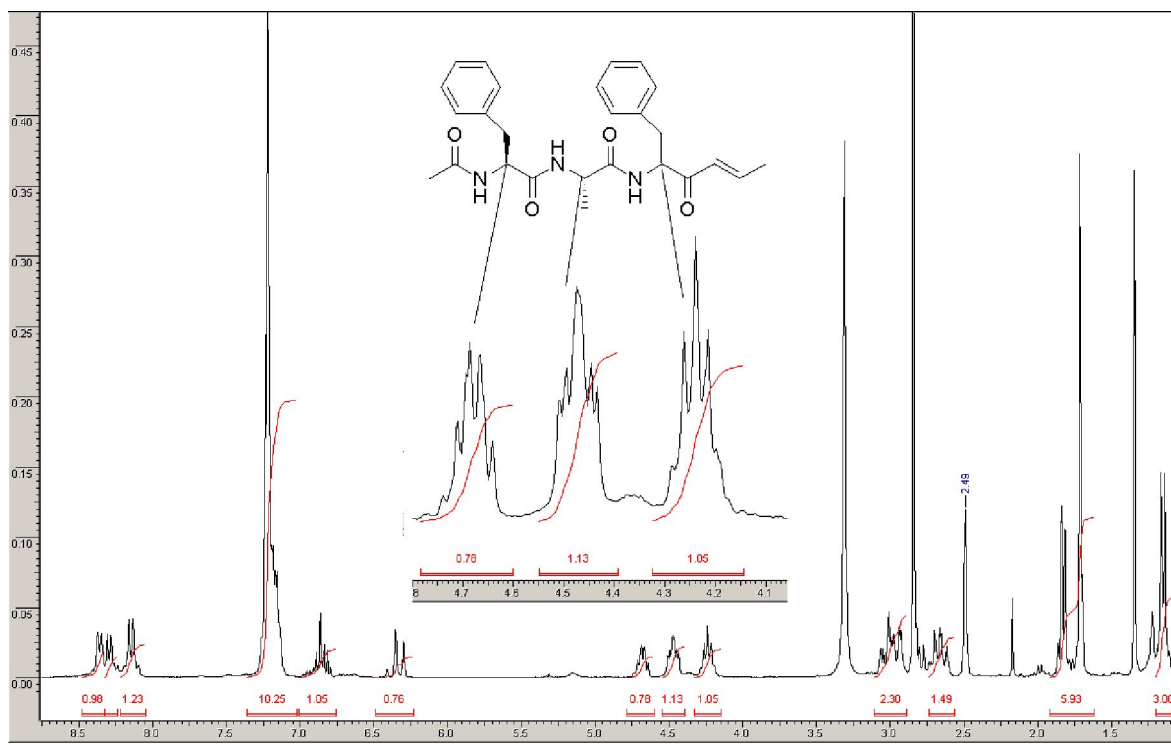


Abbildung 64: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des hergestellten Peptidyl-Vinylketon **58h**.

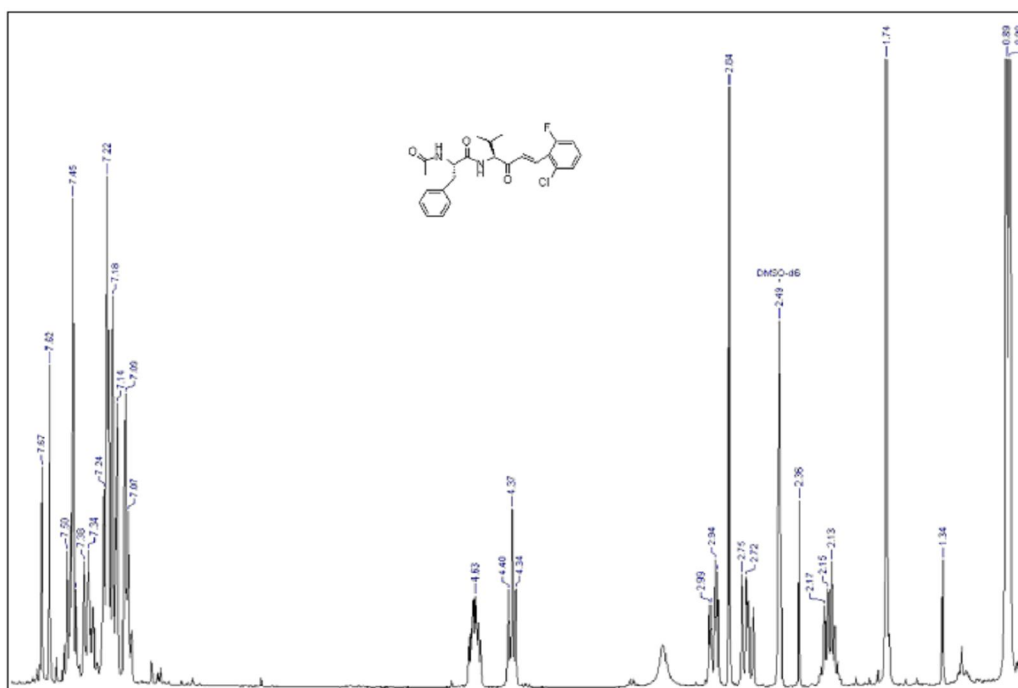


Abbildung 65: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eines weiteren Peptidyl-Vinylketon **58e**.

Mit Hilfe der NMR-Analytik konnte gezeigt werden, dass die meisten Produkte razemisierungsfrei hergestellt worden sind. Über die Kupplungskonstante der Protonen des Olefins konnte nachgewiesen werden, dass wie erwartet nur das *E*-Isomer entstanden ist. Die bei Raumtemperatur durchgeführte Wittig-Abspaltung mit aromatischen Aldehyden verlief nicht erfolgreich. Der Einsatz aromatischer Aldehyde in der Wittig-Abspaltung erforderte eine Reaktionstemperatur 60 °C und lieferte nach einer Reaktionszeit von 8 h das gewünschte Produkt (Tab 9). Die so synthetisierten Peptidyl-Vinylketone **58a-i** wurden als Ausgangstoffe für die Synthese von Peptidheterozyklen eingesetzt.

4.5.3 Darstellung von Peptidheterozyklen ausgehend von Peptidyl-Vinylketonen (**58a-i**)

4.5.3.1 Darstellung von Peptidylpyrazolin (**82**) und die weitere Oxidation zum Peptidylpyrazol (**83**)

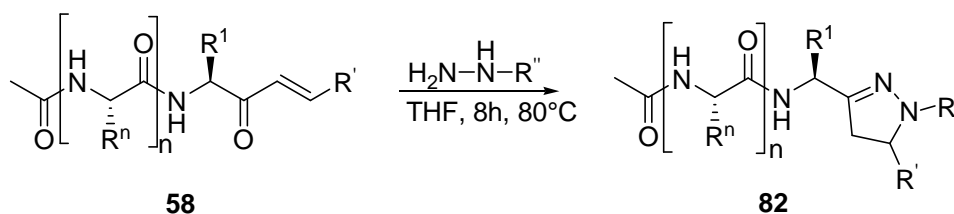


Abbildung 66: Methode der peptidyl-Pyrazolinsynthese ausgehend vom Peptidyl-Vinylketonen **58**.

Die Modifizierung Peptidyl-Vinylketone am C-Terminus zum Peptidyl-Pyrazolin (Abb 66) und die anschließende Oxidation zum Pyrazol (Abb. 67) war ein weiterer wesentlicher Teil dieser Arbeit. Der Pyrazolring ist in vielen biologisch relevanten Verbindungen vorhanden, die beispielhaft als Inhibitoren der die HIV-1 Reversen Transkriptase und Dipeptidyl-Peptidase IV verwendet werden.^[99,100] Der Pyrazolring ist auch ein wichtiger Baustein in verschiedenen Medikamenten wie z.B. dem Antidepressionsmittel Zometapine,^[101] und dem antibakteriellen Wirkstoff FR21818.^[102] Die bis jetzt literaturbekannten Pyrazolsynthesen ausgehend von nicht-peptidischen Vinylketonen sind unter Anwendung von Basen wie Natriumethanolat als Katalysator durchgeführt worden.^[103] Für unsere Synthese waren diese Konzepte ungeeignet, weil die Anwendung solcher Basen zur

Razemisierung der Stereozentren des Peptidrestes führen würde. Deshalb haben wir nach milderer Reaktionsbedingungen gesucht.

Tabelle 10: Optimierungen der Reaktionsbedingungen der Pyrazolinsynthese.

Position	Reaktionsbedingungen	Produkt	Reinheit ^[a]	Ausbeute ^[a]
1	Hydrazin (2 eq.), EtOH, 8 h, 80 °C NaOEt (0.3 eq.),	Nur Pyrazol	73 %	66 %
2	Hydrazin (2 eq.), NaOEt (0.1 eq.), EtOH, 8h, 80°C	Pyrazol+Pyrazolin	56 %	72 %
3	Hydrazin (2 eq.), THF, 8h, 80°C	Pyrazol+Pyrazolin	70 %	68%
4	Hydrazin (2 eq.), THF, 8h, 80°C, unter Stickstoff	Nur Pyrazolin	70 %	74%

[a] Reinheiten von Rohprodukten, [b] Ausbeuten von den Rohprodukten.

Um die Razemisierung zu unterdrücken, wurde die Basenmenge wie in Tab. 10 (Eintrag 1) beschrieben, reduziert. Dabei wurde das Pyrazolprodukt in razemisierter Form erhalten. Bei einer weiteren Reduzierung der eingesetzten Basenmenge (Tab. 10, Eintrag 2) entstand eine Mischung von Pyrazol und Pyrazolin. Um das Problem der Razemisierung zu beseitigen, wurden andere schwächere Basen wie Et₃N oder DIPEA verwendet. Jedoch führten diese Versuche nicht zum Zielprodukt. Bei der LC-MS-analytik war hauptsächlich das Edukt zu beobachten.

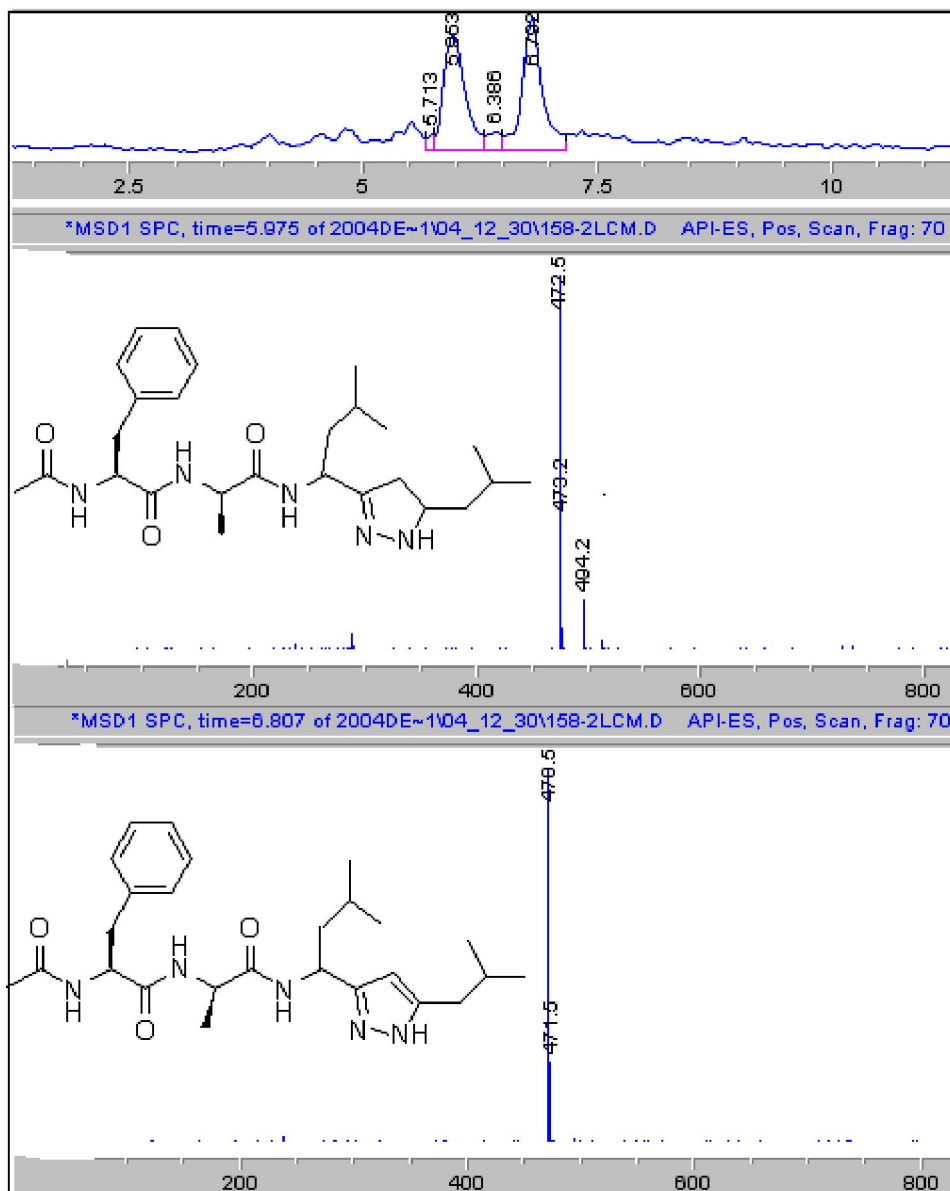
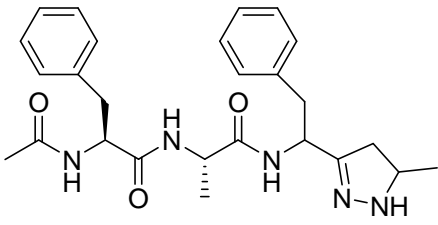
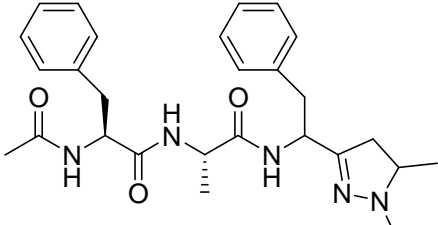
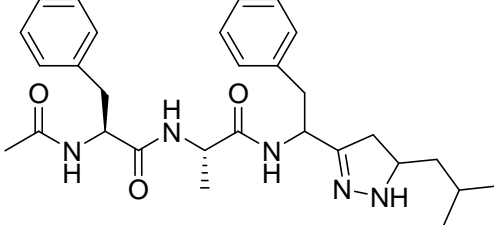
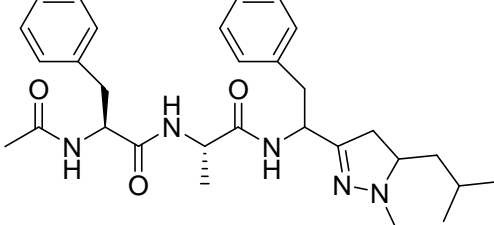


Abbildung 67: Ein Gemisch von Pyrazol und Pyrazolin bei der Anwendung von (0.1 eq.) Natriummethanolat (Tab. 10, Eintrag 2).

Bei der Durchführung der Synthese ohne die Base unter Luftsauerstoff wurde eine Mischung von Pyrazolin und Pyrazol erhalten (Tab. 10, Eintrag 3). Vermutlich hat der Luftsauerstoff ausgereicht für die Oxidation des Pyrazolins zum Pyrazol. Unser Ziel war wiederum die Synthese von Pyrazoline und nicht eine Mischung aus zwei Verbindungsklassen. Deshalb wurde die zuletzt beschriebene Methode unter Sauerstoffausschluß wiederholt (Tab 11, Eintrag 4). So ist nur das Pyrazolin zu erhalten.

Tabelle 11: Peptidylpyrazoline ausgehend von Peptidyl- α,β -ungesättigten Ketonen **58**.

Produkt	Produkt	Reinheit ^[a]	Ausbeute ^[b]
82a		95 %	65 %
82b		98 %	61 %
82c		89 %	67 %
82d		95 %	66 %

[a] Reinheiten von Rohprodukten, [b] Ausbeuten von den isolierten Produkten.

Die Daten der LC-MS-Analytik waren unzureichend, um die Zyklisierung zum Pyrazolin zu bestätigen (Abb. 67), da das Produkt mit dem Hydrat-Ion Massengleich ist.

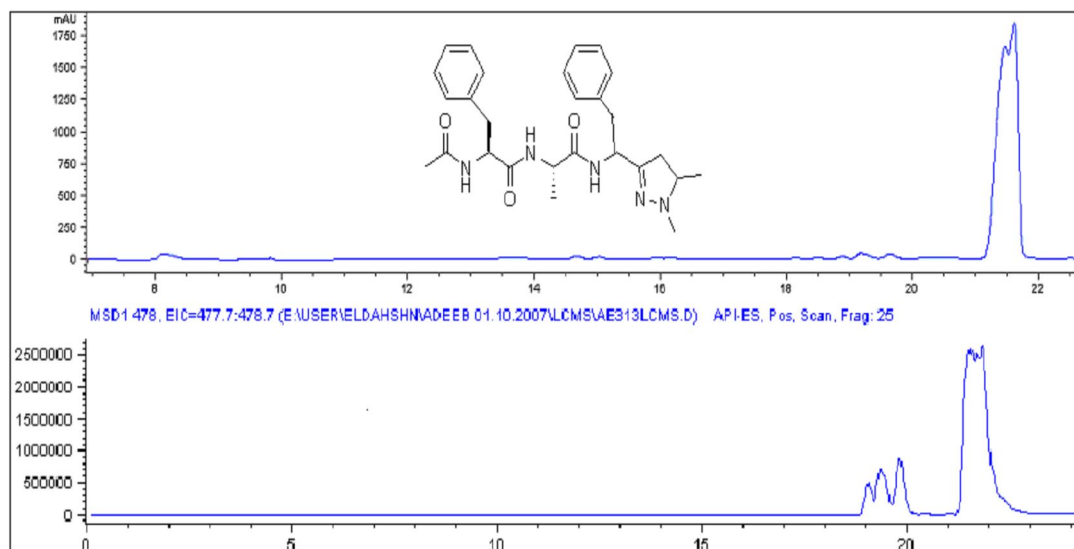


Abbildung 68: LC-MS vom Rohprodukt eines der synthetisierten Peptidylpyrazolinen **82b**.

Erst die NMR-Spektren aller synthetisierten Pyrazolinverbindungen haben gezeigt, dass die Protonen des Olefins nicht mehr vorhanden waren. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Zyklisierung zum Pyrazolin erfolgt ist. Es lässt sich über die NMR-Spektren auch feststellen, dass ein Diastereomerenmisch entstanden ist. Nach Etablierung der Pyrazolinsynthese wurden einige Pyrazolinmodellverbindungen hergestellt (Tab. 11), die anschließend zu den Pyrazolen **83** weiter oxidiert werden sollten.

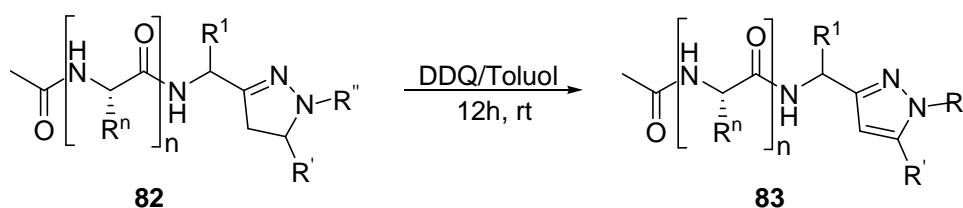
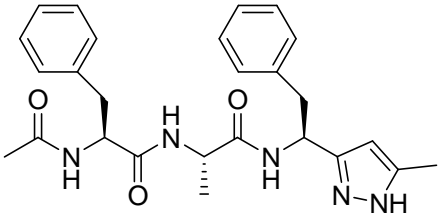
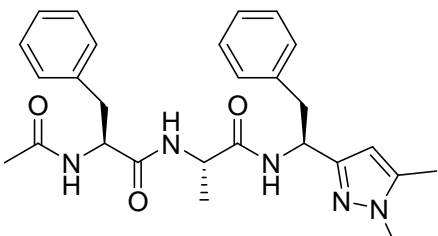
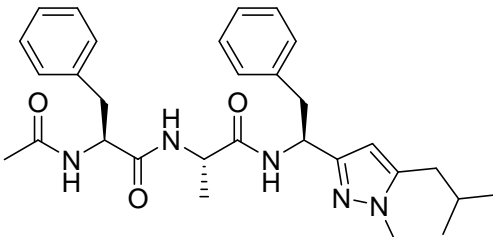
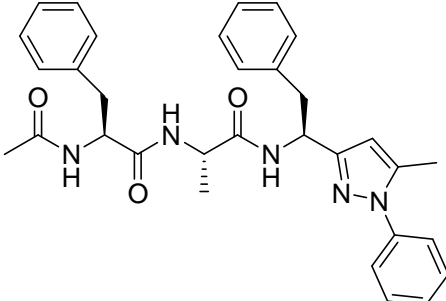


Abbildung 69: Milde Oxidation mit DDQ zum Peptidyl-Pyrazol **83**.

Die weitere Oxidation aller Verbindungen zum Pyrazol wurde mit DDQ als Oxidationsmittel durchgeführt (Abb. 69). Laut Literatur wird die Oxidation unter Rückfluss durchgeführt.^[104] Die Darstellung der Verbindungen **83a-d** gelang bereits bei Raumtemperatur (Tab. 12).

Tabelle 12: Entstandene Peptidyl-Pyrazole durch Oxidation der Pyrazoline mit DDQ.

Produkt	Produkt ^[c]	Reinheit ^[a]	Ausbeute ^[b]
83a		>95 %	>90 %
83b		>95 %	>90 %
83c		>95 %	>90 %
83d		>95 %	>90 %

[a] Reinheiten von Rohprodukten, [b] Ausbeuten von den isolierten Produkten, [c] überwiegendes Diastereomer.

Alle Verbindungen wurden chromatographisch gereinigt und anschließend mittels LC-MS und NMR die gelungene Oxidation zu den Peptidylpyrazolen nachgewiesen. Mittels NMR konnte nachgewiesen werden, dass die entstandenen Produkte epimerisiert sind. Die

Synthese wurde aber regioselektiv durchgeführt (Abb. 70). Das entstandene Regioisomer ist in Tabelle. 12 veranschaulicht.

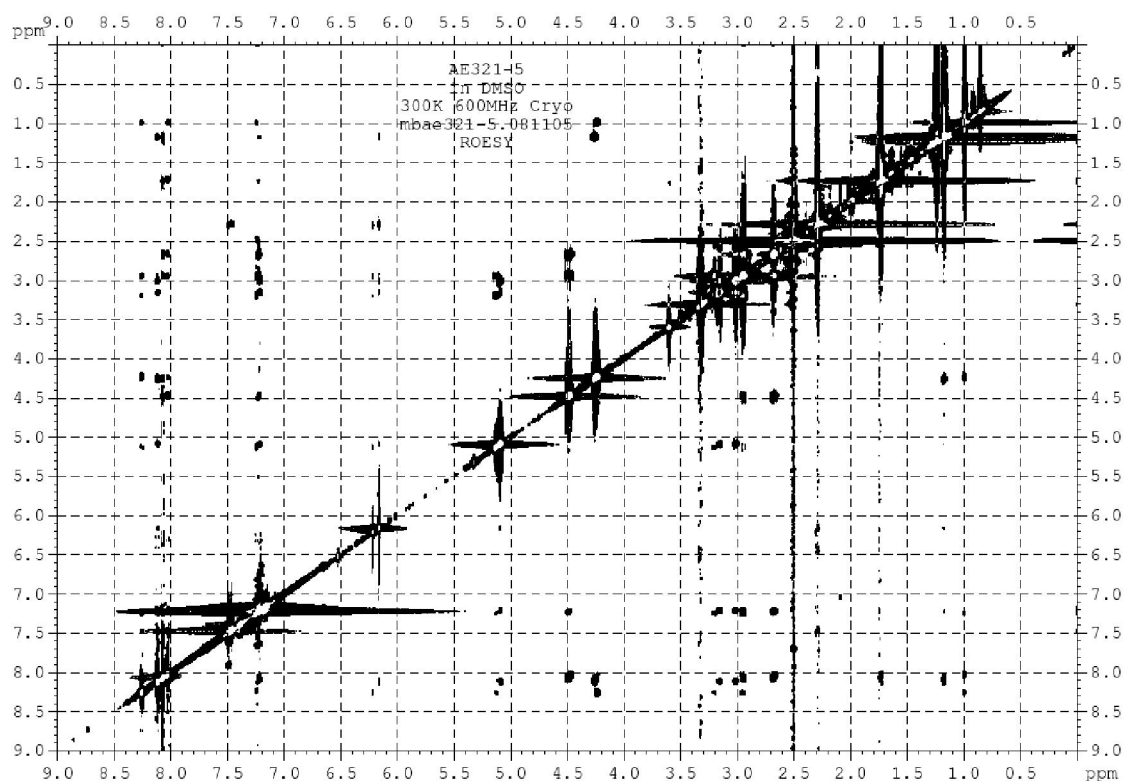


Abbildung 70: ROESY-NMR von **83d** (Tab. 12), das 2.28 ppm die Korrelation der Protonen des Methylrestes mit dem vom Phenylring des Pyrazols bei 7.4 ppm zeigt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Peptidyl-Vinylketone **58** geeignete Ausgangsstufen für die regioselektive Synthese von Peptidylpyrazolinen unter Ausschluss von Luftsauerstoff sind. Die weitere Oxidation mittels DDQ zum epimerisierten Peptidylpyrazolen wurde auch erfolgreich durchgeführt.

4.5.3.2 Darstellung von Peptidyl-isoxazolinen **84**

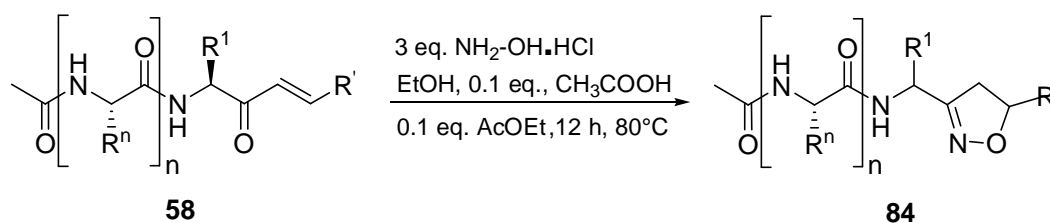
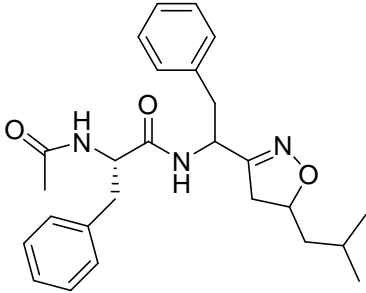
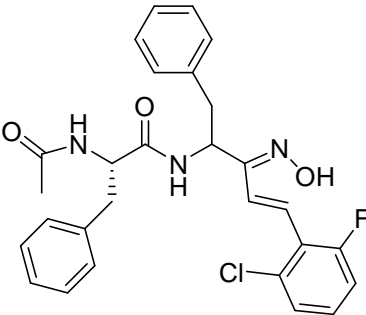


Abbildung 71: Konzept der Peptidyl-isoxazolinsynthese ausgehend vom Peptidyl-Vinylketon **58**.

Die Synthese von Peptidylisoxazolinen als weitere neue Verbindungsklasse wurde ausgehend von Peptidyl-Vinylketonen untersucht. Einige Isoxazolderivate sind als Inhibitoren für z. B. D-Aminosäure-oxidase (DAAO), Rezeptor Tyrosin Kinase (RTK), und Heat shock protein (Hsp90) bekannt.^[105,106,107] Zu den im Vorfeld synthetisierten Peptidyl-Vinylketonen wurde Hydroxylaminhydrochlorid in Anwesenheit einer katalytischen Menge von CH₃COOH bei 80 °C gegeben. Die Reaktionszeit war abweichend von der Literatur (6 h) erst nach 12 h beendet.^[108,109]

Tabelle 13: Isoxazolin-Peptidmimetikum und Peptidyl-Vinyloxim ausgehend vom Peptidyl-Vinylketon **58**.

Prod.	Struktur	Reinheit ^[a]	Ausbeute ^[b]
84a		80 %	68 %
84b		90 %	85 %

[a] Reinheiten des Rohproduktes [b] Ausbeute des isolierten Produktes

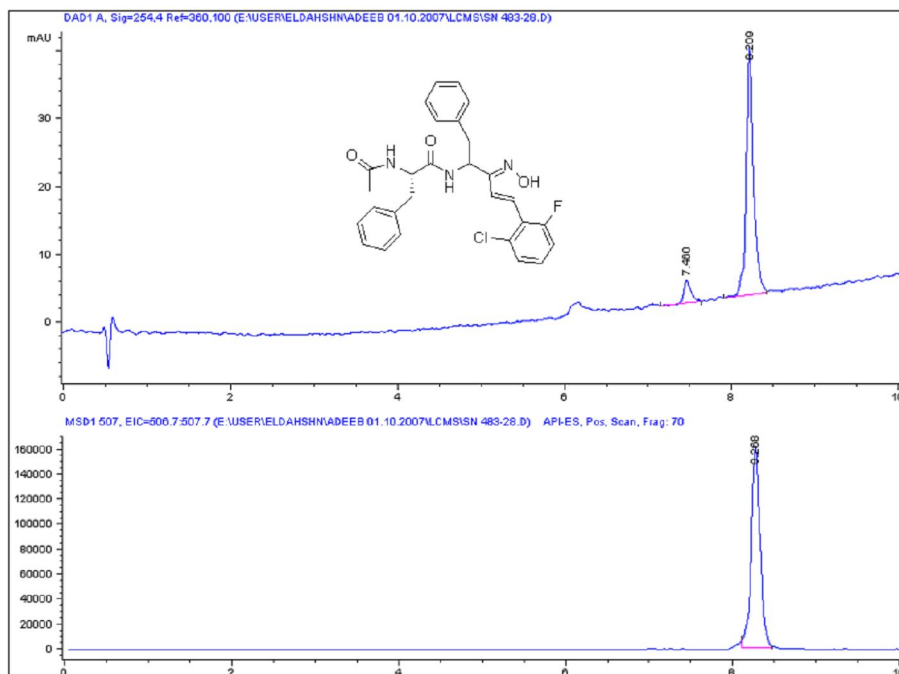


Abbildung 72: LC-MS des Peptidyl-Oxim **84b**.

Die zwei synthetisierten Modellverbindungen **84a**, **84b** wurden chromatographisch gereinigt. Die ^1H -NMR-Auswertung zeigte die Epimerisierung der Produkte wahrscheinlich auf Grund der Durchführung der Synthese bei hohen Temperaturen. Beim Produkt **84b** kam es nicht zur zyklisierung. Ein Oxim wurde gebildet, der die gleiche Masse wie das Isoxazolin hat. Doch die Protonen des Olefins bei (6.77 ppm, 6.83 ppm) und das Proton der OH-Gruppe des Oxims bei (8.4 ppm) waren zu detektieren. Mit ^{19}F -NMR konnten zwei Rotamere (-111.77 ppm, -74.74 ppm) nachgewiesen werden.

4.5.3.3 Synthese Peptidyl-3H-Benzodiazepinen (**85**)

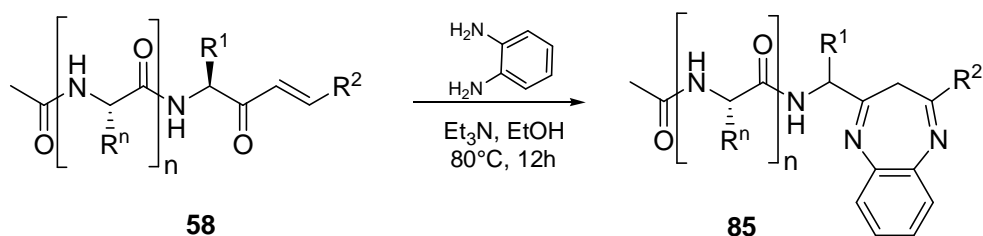


Abbildung 73: Konzept der Diazepinsynthese ausgehend vom Peptidyl-Vinylketon **58**.

Die Benzodiazepin-flankierten Peptidheterozyklen sind eine weitere Verbindungsklasse, die auch untersucht wurde. Benzodiazepinderivate sind bekannt als privilegierte Mimetika für β -Turn-Strukturen.^[110] Die Synthese von Peptidylbenzodiazepin ausgehend von Peptidyl-Vinylketon **63** wurde untersucht.^[111,112] Das in EtOH gelöste 1,2-Phenylendiamin wurde zum Peptidyl-Vinylketon **58** unter Rühren hinzugegeben. Dazu wurden katalytische Mengen an Et₃N (10 mol%) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 80°C gerührt. Bei der LC-MS-Analytik in Abb 81 sind zwei UV-Spuren mit der gleichen Massen bei verschiedenen Laufzeiten zu beobachten. Das deutet daraufhin, dass die Reaktionsbedingungen zur Razemisierung bzw. zur Epimerisierung geführt haben. Beide Diastereomere waren relativ leicht chromatographisch zu trennen. Das hauptentstandene Diastereomer (77 %) wurde chromatographisch getrennt und mit NMR-Spektroskopie analysiert

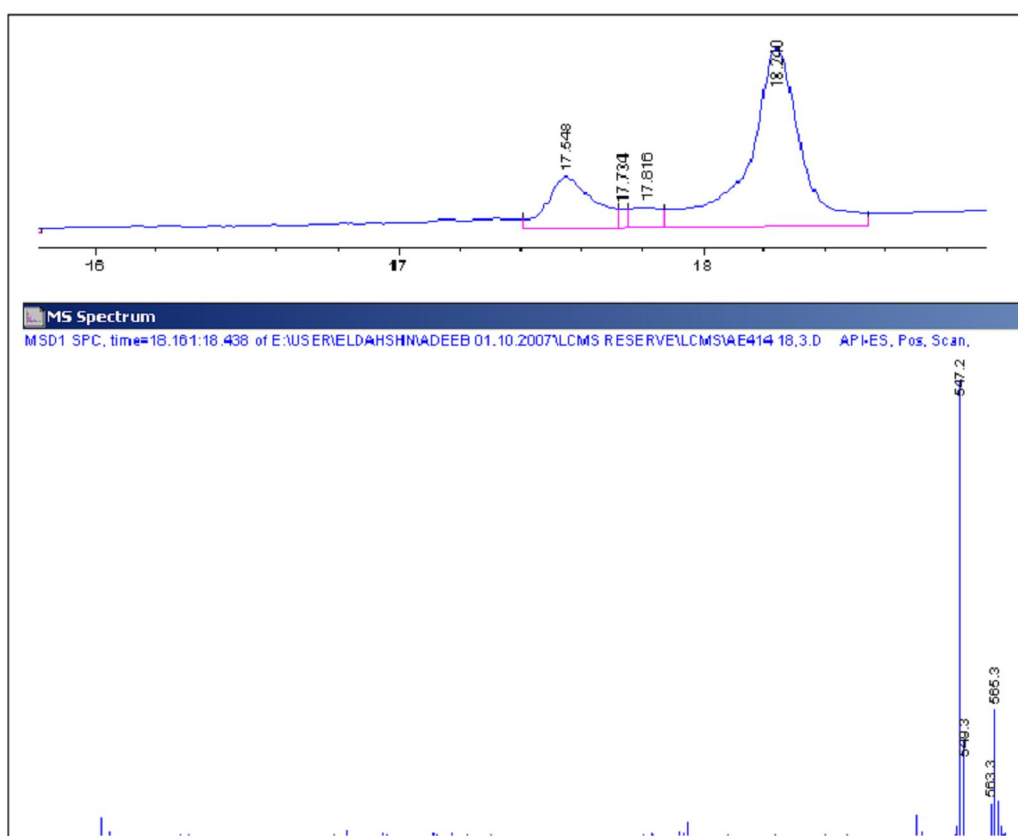
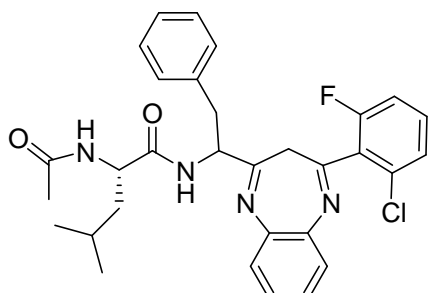
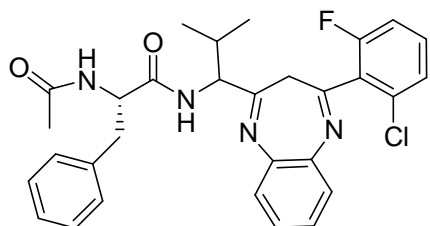


Abbildung 74: LC-MS-Spektrum des Rohproduktes **85a**.

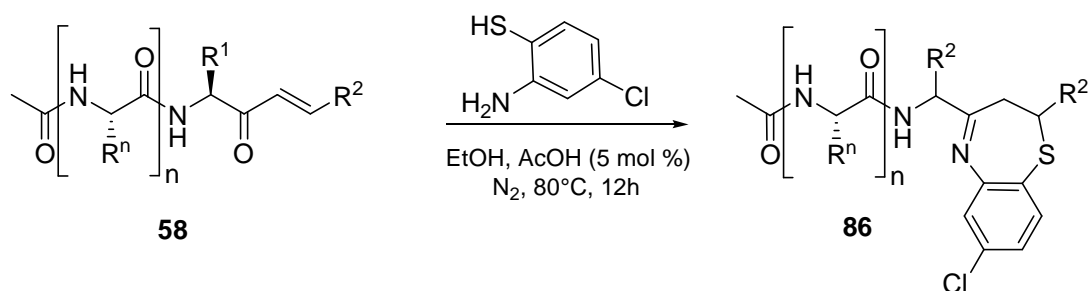
Tabelle 14: 3H-Diazepin-flankierte Peptidisoostere.

Produkt	Struktur	Reinheit ^[a]	Ausbeute ^[b]
85a		80 %	48 %
85b		40 %	50 %

[a] Reinheit vor der Reinigung, [b], Reinheit vom Rohprodukt

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Synthese von Peptidylbenzodiazepine ausgehend von den im Vorfeld hergestellten α,β -ungesättigten Verbindungen erfolgreich durchgeführt worden ist.

4.5.3.4 Synthese von Peptidyl-2,3-Dihydro-Thiazepinen (**86**)


Abbildung 75: Konzept zur Synthese der Peptidyl-2,3-Dihydro-Thiazepinen **86** ausgehend von Peptidyl-Vinylketon.

Thiazepine sind im Rückgrat vieler biologisch relevanter Verbindungen vorhanden.^[113] Besonders die mit Aromaten und Heterozyklen substituierten Peptidylthiazepine stellen

eine weitere interessante Stoffklasse in der medizinischen Chemie dar.^[114] Um die Synthese von Thiazepinen ausgehend von Peptidyl-Vinylketone Ausgangsverbindungen **58** zu untersuchen, wurde analog zur Literatur in EtOH gelöstes 4-Chlor-Aminothiophenol und anschließend katalytische Mengen an Essigsäure (5 mol %) unter N₂ hinzugegeben.^[115] Der Reaktionsverlauf wurde stündlich mittels LC-MS-Analytik kontrolliert. Erst nach 12 h wurde das Edukt vollständig zum Produkt umgesetzt mit zufriedenstellenden Ausbeuten.

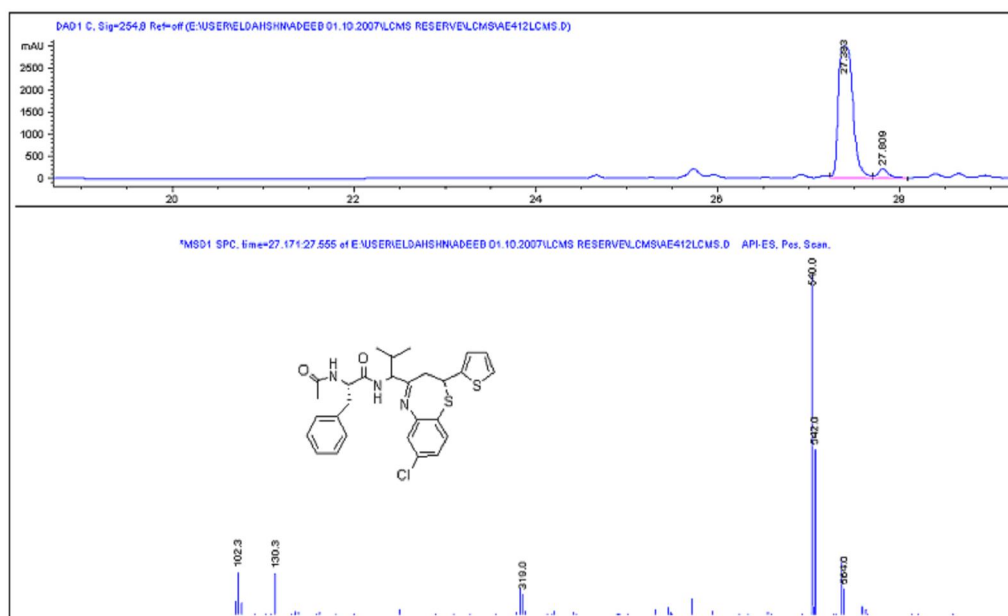


Abbildung 76: LC-MS-Analytik des Rohproduktes **86a**.

Mit diesem Syntheseweg wurden fünf verschiedene Modellverbindungen **86a-d** synthetisiert und in Tabelle 15 zusammengefasst. Nach der chromatographischen Reinigung wurde die Epimerisierung der entstandenen Produkte mittels NMR nachgewiesen.

Tabelle 15: Modellverbindungen der Peptidyl-2,3-Dihydrothiazepinen **86**.

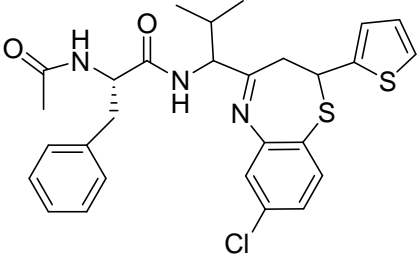
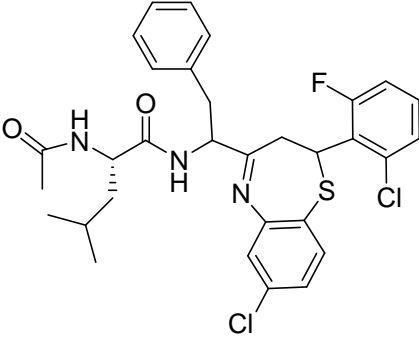
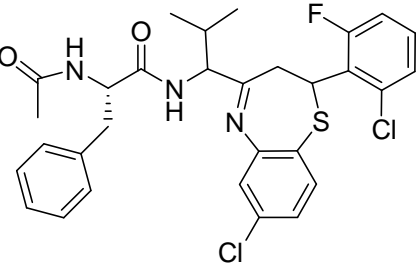
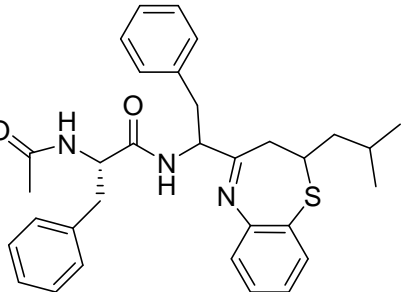
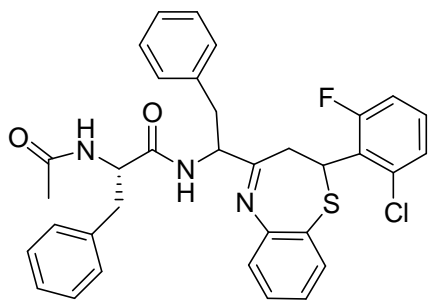
Produkt	Struktur	Reinheit ^[a]	Ausbeute ^[b]
86a		80 %	52 %
86b		50 %	55 %
86c		78 %	75 %
86d		60 %	63 %

Tabelle 15: Fortsetzung

Produkt	Struktur	Reinheit ^[a]	Ausbeute ^[b]
86e		64 %	71 %

[a] Reinheit vor der Reinigung, [b] Ausbeute nach der chromatographischen Reinigung

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Synthese der Verbindungsklasse **86** ausgehend vom Peptidyl-Vinylketon **58** synthetisch möglich ist.^[116,117] Mittels NMR-Charakterisierung war festzustellen, dass in den meisten Fällen ein Diastereomergemisch entstanden ist (z.B. **86a** und **86b**). Bei anderen Produkten war nur die Epimerisierung nachzuweisen (z.B. **86e**).

4.5.3.5 Peptidylloxiran (**88**)

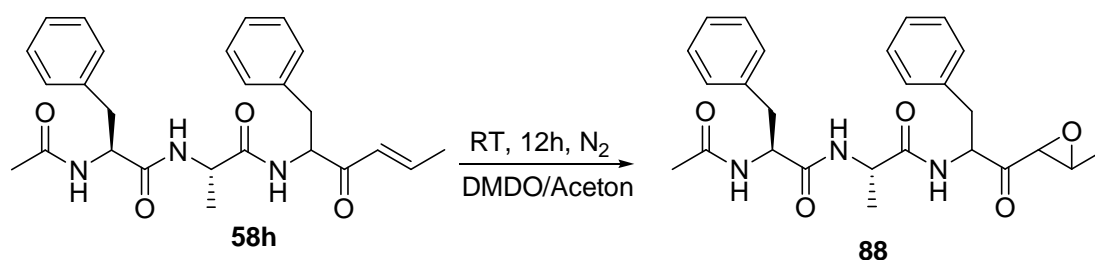


Abbildung 77: Epoxidierung vom Peptidyl-Vinylketon **58h** mit DMDO.

Epoxide sind in vielen irreversiblen Inhibitoren enthalten. Beispiel dafür ist der oft verwendete Inhibitor von Papain-ähnlichen Cysteinproteasen, E-64. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Synthese von Peptidylepoxiden ausgehend von Peptidyl-Vinylketon **58h** bearbeitet, der im Vorfeld vorbereitet worden ist, bearbeitet. Die Epoxidierung von elektronenreichen, ungesättigten Verbindungen wurde in zahlreichen Literaturstellen berichtet.^[118] Erst in den 1990er Jahren wurde von der Epoxidierung von

elektronenärmeren, ungesättigten Ketonen und Estern mit DMDO berichtet.^[119,120] Die letzte Methode erschien uns attraktiver als die mit Wasserstoffperoxid oder anderen starken Oxidationsmitteln zu sein, weil laut Literatur so gut wie keine Nebenprodukte entstehen. Ein weiterer Vorteil ist, dass man nach vollständiger Umsetzung das restliche DMDO über die Evaporierung entfernen kann. Die Epoxidierung verlief über die Zugabe des frisch hergestellten DMDO zum Peptidyl-Vinyketon **58h** bei 0 °C. Der Reaktionsverlauf wurde mit der LC-MS-Analytik verfolgt. Eine vollständige Umsetzung zum Produkt **88** war nach einer Reaktionszeit von 12 h festzustellen.

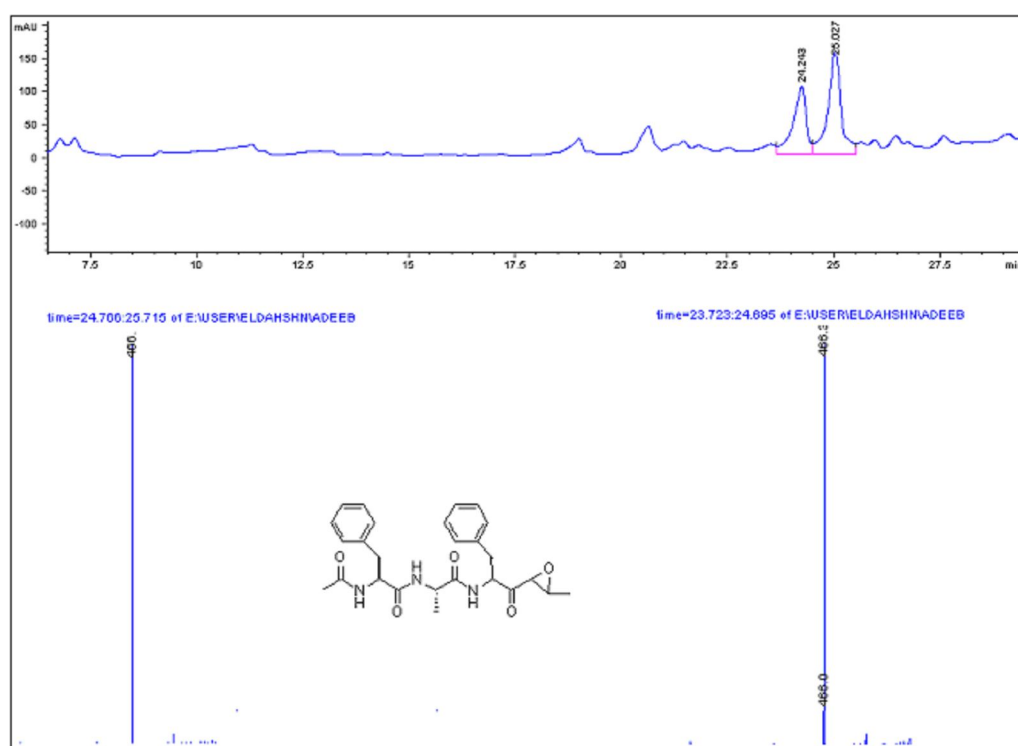


Abbildung 78: LC-MS vom Rohprodukt **88** nach 12h Reaktionszeit.

Im Chromatogramm wurden zwei annähernd gleich intensive breite Peaks mit derselben Masse ($M^+=466$) gefunden (Abb. 78). Das deutete daraufhin, dass zwei Diastereomere entstanden sind. Die beiden Diastereomeren waren gut chromatographisch zu trennen (Abb 79). Bei der Charakterisierung der NMR-Spektren von den isolierten Produkten sind zwei Produkte im Verhältnis (1:1) festzustellen.

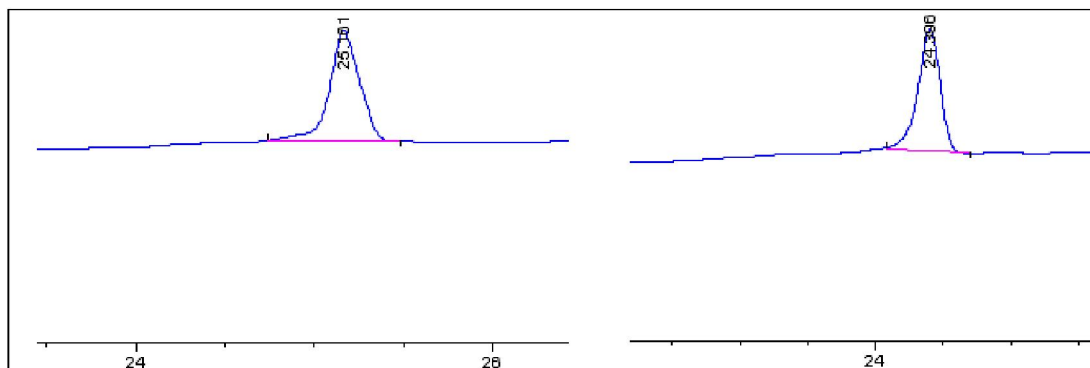


Abbildung 79: Zwei LC-MS Spektren der entstandenen Oxirandistereomeren **87** nach der präparativen Reinigung.

4.6 Die erste Festphasensynthese von *N*-acylierten Sphingosinen (93)

Die *N*-acylierten Sphingosine, auch Ceramide genannt, sind eine Untergruppe der Sphingolipide (Abb. 80), die als intra- aber auch interzelluläre Signalmoleküle identifiziert worden sind.^[121] Ceramide vermitteln bei einigen Zellfunktionen das Zellwachstum, sowie Differenzierung der Zellen und Zell-Zell-Wechselwirkungen. *N*-acylierte Sphingosine werden auch bei der Erforschung des Mechanismus der Apoptose (der programmierte Zelltod) bei vielen Krebszelllinien angewendet, was im Rahmen dieser Arbeit mit zwei verschiedenen Tumorzelllinien behandelt wurde (Kap. 4.6.3). Ein zentraler Baustein der Ceramide ist Sphingosine. Sphingosine sind trans-ungesättigte vicinale C-18 Aminodialkohole. Andere Kettenlängen von C-16, C-17, C-19, oder C-20 sind eher selten.^[122] Die meisten natürlich vorkommenden Sphingosine weisen die (2*S*, 3*R*)-Konfiguration) (*D*-*Erythro*) auf.^[123,124]

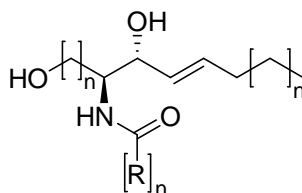
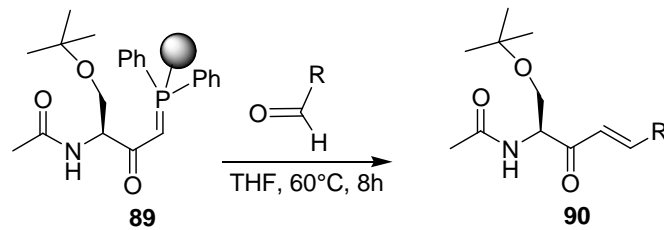


Abbildung 80: Allgemeine Struktur der natürlich vorkommenden Ceramide.

Aufgrund der Bedeutung dieser Verbindungsklasse sind viele Synthesestrategien entwickelt worden. Wichtig bei allen diesen Strategien ist die Einhaltung der Diastereochemie (korrekte erythro- bzw. anti-Konfiguration). Alle der bis jetzt bekannten Synthesestrategien sind klassische Mehrstufen-Synthesen in Lösung. Diese Strategien sind zeitaufwändig und die Variation der Substituenten bei der Synthese ist limitiert. Die Synthese von *N*-acylierten Ketosphingosinen an der festen Phase und die weitere stereoselektive Reduktion zur Herstellung der *anti*-Konfiguration wurde in dieser Arbeit erforscht.

4.6.1 *N*-Acylierte Ketosphingosine (**91a-c**)

Die *N*-acylierten Ketosphingosine sind nicht nur bekannt als Vorstufen bei der Synthese von Ceramiden, sondern auch als biologisch relevante Verbindungen, die neulich als cytotoxische Verbindungen gegen die Zelllinie HL-60 Anwendung gefunden haben,^[125] um den den Verlauf des Mechanismus der Apoptose zu untersuchen. Unser Ziel war es, die erste Festphasensynthese von *N*-acylierten Ketosphingosinen **91a**, **91b** und **91c**, Sphingosinen und Ceramiden, zu etablieren. Die Reaktionsschritte wie die Alkylierung am Triphenylphosphinharz mit Bromessigsäureester, die Deprotonierung mit Triethylamin, die Acylierung mit Fmoc-Serin(*t*Bu)-OH und MSNT/Lutidin als Aktivierungsmittel, die Acetylierung am N-Terminus mit Essigsäureanhydrid, und anschließend die Abspaltung der TMSE-Schutzgruppe verliefen analog (Kap. 4.1). Die gewünschten *N*-acylierten Ketosphingosine wurden dann über die Wittig-Abspaltung mit verschiedenen Aldehyden ausgehend von Verbindung **89** erhalten.



für R= aliphatisches Aldehyd, ungesättigtes Aldehyd, oder aromatisches Aldehyd

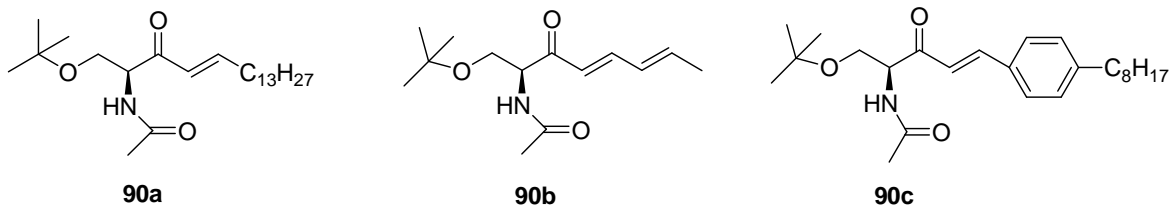


Abbildung 81: Erstes Festphasenkonzept zur Synthese von *tert*-Bu-geschützten *N*-acylierten Ketosphingosinen **90**.

Die Variation am N-Terminus wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, ist aber mit Hilfe der Festphasensynthese durch einfache Acylierung möglich, um verschiedene Klassen von Ceramiden ($C_3\text{cer}$, $C_4\text{cer}$, usw...) zu erhalten. Um die Leistungsfähigkeit des Konzeptes (Abb. 21) zur Synthese verschiedener *N*-acylierter Ketosphingosine zu beweisen, wurden verschiedene Aldehyde zur Wittig-Abspaltung eingesetzt: Ein ungesättigtes Aldehyd (Crotonaldehyd) und ein aromatisches (4-Octylbenzaldehyd) waren kommerziell erhältlich, das Tetradecanal wurden durch die Oxidation des Tetradecanols mit IBX wie folgt synthetisiert:

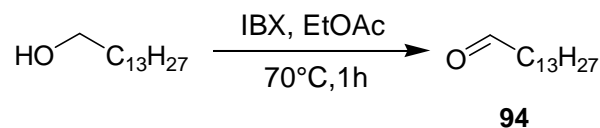


Abbildung 82: Oxidation von Tetradecanol mit IBX zum Tetradecanal **94**.

Zuerst wurde das weitgehend bekannte IBX analog der Literaturbeschreibung aus Iodbenzoesäure und Oxon synthetisiert.^[126,127] Statt die nachfolgende Acetylierung zum DMP^[128] durchzuführen, um das IBX zu stabilisieren, wurde das IBX in Ethylacetat direkt unter Rühren gelöst. Anschließend wurde das Tetradecanol bei Raumtemperatur

dazugegeben. Die trübe Reaktionsmischung wurde anschließend bei 70°C unter Rückfluß gerührt und in zeitgleichen Abständen (alle 15 min.) wurde der Verlauf der Reaktion dünnschichtchromatographisch untersucht (Hexan:EtOAc, 1:1). Nach einer Stunde war der Alkohol vollständig zum Aldehyd umgesetzt. Das Produkt wurde abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingengt. Bei der Charakterisierung mit $^1\text{H-NMR}$ war das Signal des Aldehydprotons bei (9.75 ppm) zu detektieren.

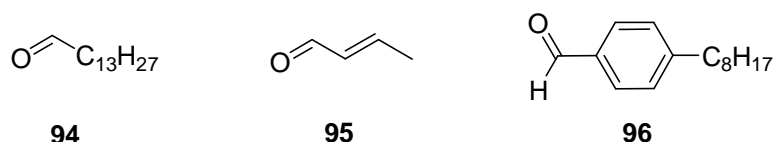
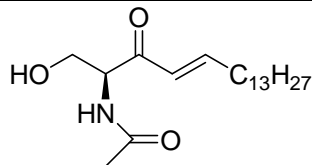
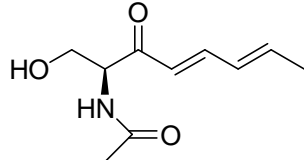
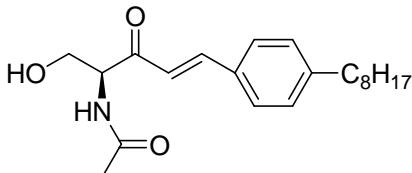


Abbildung 83: Drei verschiedene Aldehyde Tetradecanal **94**, Crotonaldehyd **95**, Octylbenzaldehyd **96** wurden zur Synthese von *N*-acylierten Ketoaldehyden verwendet.

Die Wittig-Abspaltung mit den drei verschiedenen Aldehyden (Abb. 82) zu den Ketosphingosinen (Tab. 16) funktionierte bei Raumtemperatur mit Ausbeuten unter 10%. Der Ansatz wurde bei 60°C wiederholt, was zu deutlich höheren Ausbeuten führte. Alle drei synthetisierten *N*-acylierten Ketosphingosine wurden über Säulenchromatographie (Hexan:EtOAc, 1:1) gereinigt und anschließend mit NMR-Spektroskopie ausgewertet. Die *tert*-Bu-Schutzgruppe wurde mit TFA/DCM abgespalten (Tab.16). Die entschützten *N*-acylierten Ketosphingosine **91a-c** wurden mit NMR-Spektroskopie charakterisiert und die Erhaltung der Stereochemie festgestellt.

Tabelle 16: N-acylierte Ketosphingosine: Vollständige Festphasensynthese.

Produkt	Struktur	Ausbeute ^[a]
91a		47 %
91b		49 %
91c		62 %

[a]Ausbeuten nach der präparativen Reinigung.

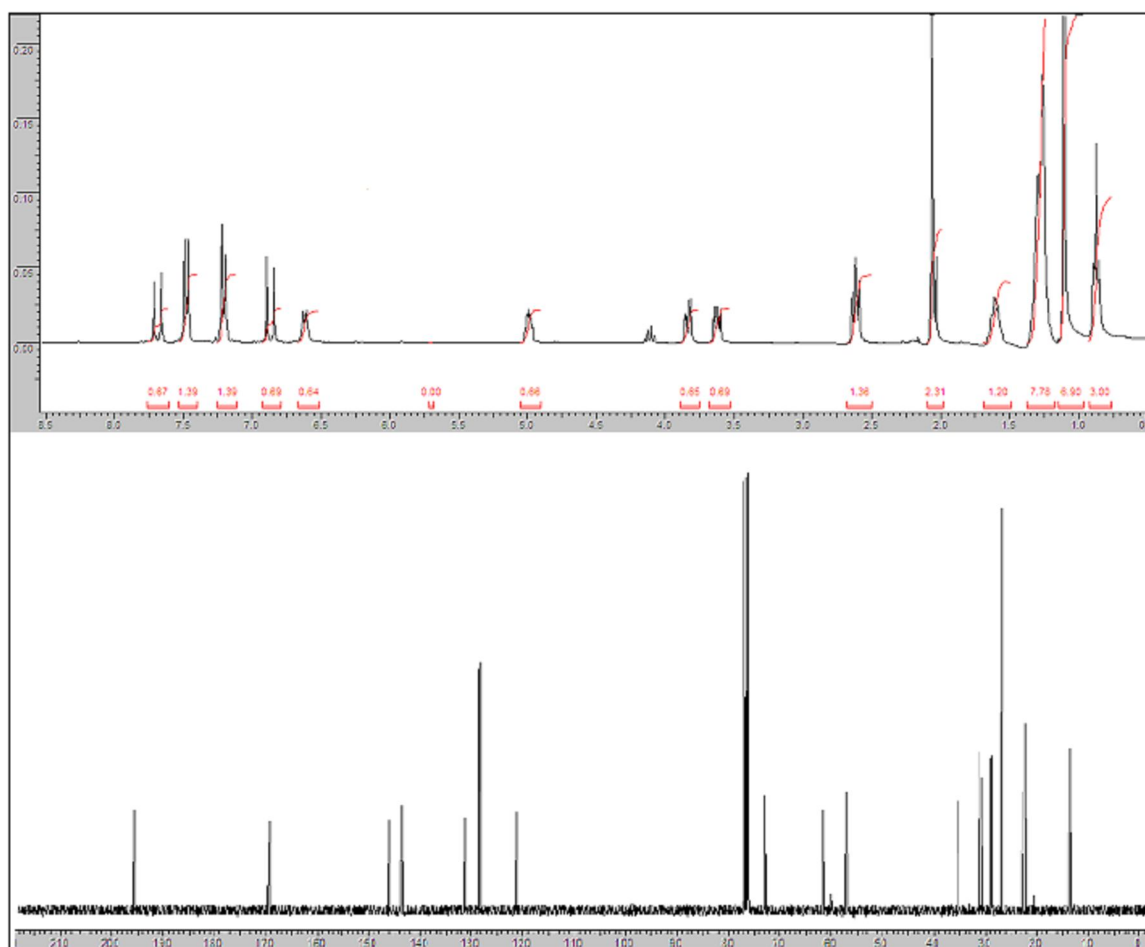


Abbildung 84: ¹H-NMR von 90c vor Abspaltung der tBu-Schutzgruppe.

4.6.2 Stereoselektive Reduktion von *N*-acylierten Ketosphingosinen (**90**) zu *N*-acylierten Sphingosinen und anschließende Abspaltung der Schutzgruppe zu (**93**)

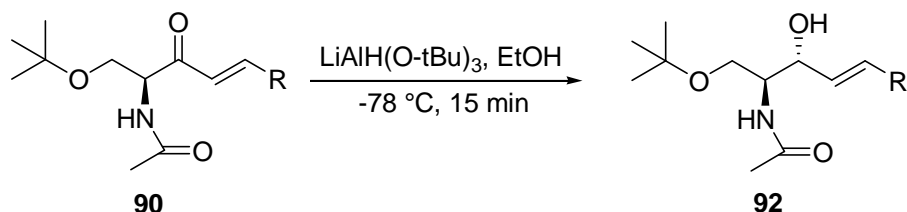


Abbildung 85: Stereoselektive Reduktion von *N*-acylierten Ketosphingosinen zu *N*-acylierten Sphingosinen.

Der nächste Schritt war die Herstellung der anti-Konfiguration durch eine stereoselektive Reduktion. In Anlehnung an die Literatur wurde das Ketosphingosin zuerst mit $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$ reduziert.^[129,130] Zwei Probleme wurden mit Hilfe der Massenspektroskopie und der NMR-Spektroskopie festgestellt. Das erste Problem war, dass die Reduktion mit dem $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$ nicht diastereoselektiv verlief (Tab. 18). Das andere Problem war die weitere Reduktion des Olefins des Ketosphingosins **90** zum Sphingamin (Abb. 86).^[131]

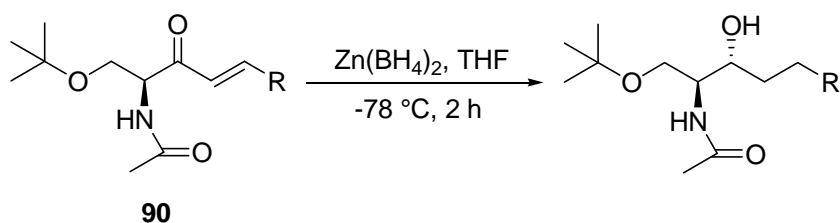


Abbildung 86: Stereoselektive Reduktion über 2h führte durch weitere Reduktion zum Sphingamin.

Die Herausforderung bestand also in der diastereoselektiven Reduktion des Ketons zum Alkohol ohne das Olefin ebenfalls zu reduzieren. Ein weiteres literaturbekanntes Reduktionsreagenz, das für diesen Zweck beschrieben wurde, ist L-Selectride.^[111,132] Leider wurde mit diesem Reagenz eine schlechtere Selektivität erreicht (Tab. 17) als mit $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$.

Tabelle 17: Selektive Reduktion mit verschiedenen Reduktionsreagenzien.

Edukt	Reduktionsbedingung	Ausbeute ^[a]	anti/syn
90a	Zn(BH ₄) ₂ , THF, -78°C, 15 min	46 %	4:1
90a	L-Selectride, THF, -78°C, 15 min	49 %	3:2
90b	LiAlH(O-tBu) ₃ , EtOH, -78°C, 15 min	0.0 %	zerfallen
90a	LiAlH(O-tBu) ₃ , EtOH, -78°C, 15 min	85 %	<95% anti
90c	LiAlH(O-tBu)₃, EtOH, -78°C, 15 min	80 %	100:00

[a]Ausbeute nach der Reinigung mit Säulenchromatographie

Kürzlich wurde in der Literatur über die Reduktion einer Carbonylgruppe eines Ketosphingosins mit LiAlH(O-tBu)₃ unter Stickstoff bei -78°C und bei einer Reaktionszeit von 15 min berichtet.^[133,134] Unter diesen Reduktionsbedingungen wurde ausschließlich das Keton und nicht das Olefin reduziert. Deshalb wurde analog zu dieser Literatur die Reduktion von **90a-c** durchgeführt. Die reduzierte und die nicht reduzierte Form der *N*-acylierten Ketosphingosine waren mit Massenspektroskopie nachgewiesen worden und konnten chromatographisch getrennt werden. Nach 15 min Reaktionszeit waren aber keine Spuren vom *N*-acylierten Sphinganolin zu detektieren. Das Produkt **92c** wurde in einer Ausbeute von 80 % erhalten, 5 % des *N*-acylierten Ketosphingosins **90c** wurden zurück erhalten. Das Produkt **92a** wurde auch in einer guten Ausbeute erreicht und **90b** wurde unter den gleichen Bedingungen zerfallen (Tab. 17). Als letzter Schritt wurde die Schutzgruppe unter sauren Bedingungen abgespalten und die Produkte **93a** und **93c** erhalten.

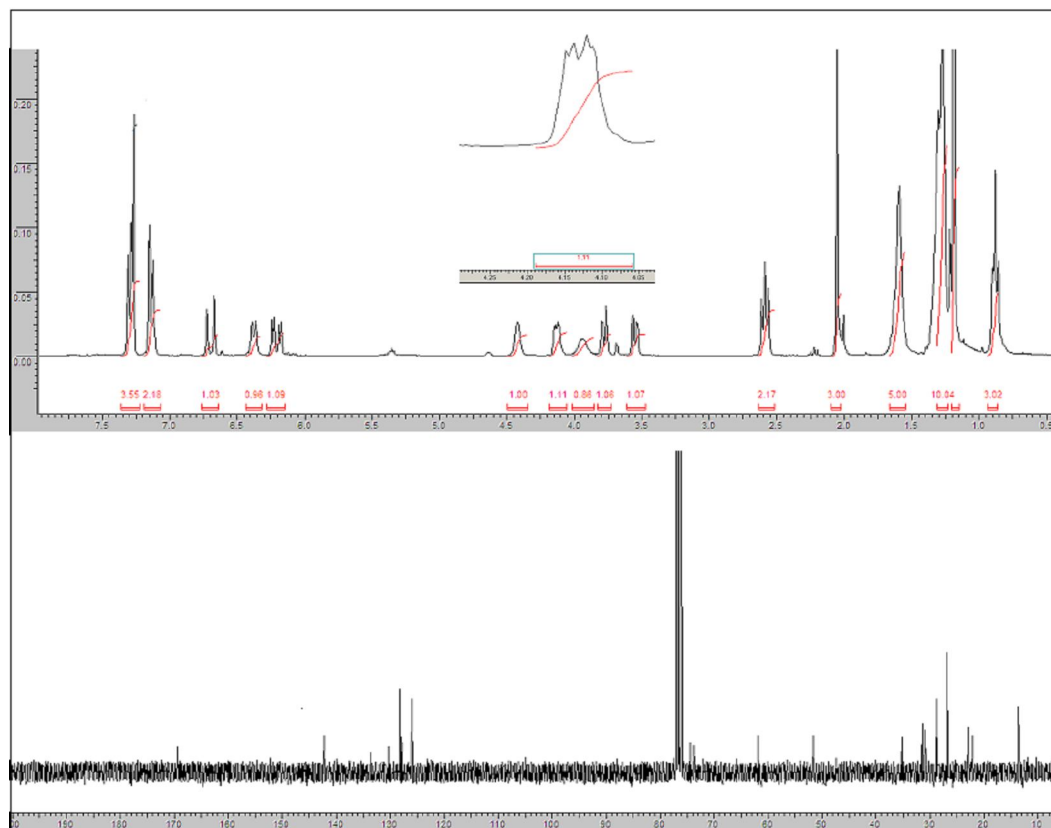


Abbildung 87: $^1\text{H-NMR}$ vom Produkt **92a**.

4.6.3 Bestimmung der Zytotoxizität mit dem Alamar Blue Assay

Die Zytotoxizität der synthetisierten Ketosphingosine in Tabelle 16 und der reduzierten Sphingosine **93a**, **93c** wurde gegenüber zwei Tumorzelllinien HEP G-2^[135,136] und PC-12,^[137,138] untersucht. Dabei diente das C₂-Ceramid **93a** für HEP G-2 (LD₅₀= 80 μM) und für PC-12 (LD₅₀= 200 μM) als Referenz, die in der Literatur angegebenen Zytotoxizitätswerte konnten bestätigt werden.

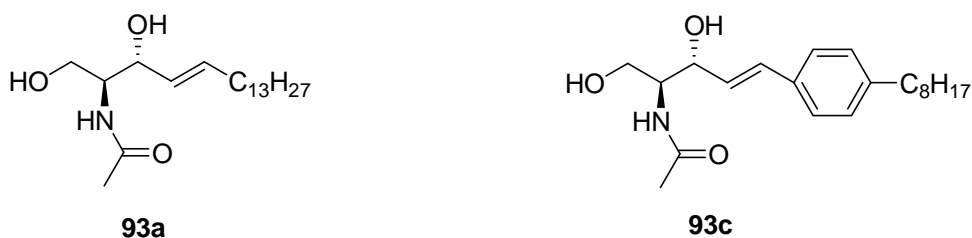


Abbildung 88: Mit $\text{LiAlH}(\text{O}-t\text{Bu})_3$ reduzierte N-acylierte Sphingosine.

Die Toxizität der synthetisierten Ketosphingosinen und Sphingosinen wurde mit dem Alamar Blue Assay bestimmt. Alamar Blue ist ein Farbstoff, der seine Absorption und Fluoreszenz in einem reduzierenden Milieu ändert. Nur lebende Zellen haben eine konstante Menge reduzierender Metabolite, so dass durch den Vergleich mit einer Kontrolle eine Aussage über die relative Toxizität der Probe gemacht werden kann. Dazu wurden Zelllinien ausgesät und anschließend bei 37 °C (5% CO₂) 24 h inkubiert. Die synthetisierten Verbindungen wurden anschließend bei verschiedenen Konzentrationen (200 µM, 100 µM, 25 µM, 10 µM, 5 µM) in DMEM-Lösung (DMEM+Glutamax+10%FBS+1%Penicillin/Streptomycin) dazu gegeben. Nach weiteren 24 h Inkubationszeit wurde das Alamar Blue (10 % des Assayvolumens) dazugegeben.^[139,140] Nach weiteren 4 h Inkubationszeit wurde die Absorption im Plattenreader bei 570 nm und 600 nm gemessen. Anschließend wurde jede weitere Stunde einmal weiter bei 37 °C gemessen. Es ist üblich, dass Verbindung **93a** gegen HEP G-2 und PC-12 (Tab. 18, Eintrag 4) aber auch oft gegen viele Tumorzelllinien wie z. B. HL-60 verwendet werden, um den induzierten apoptotischen Effekt auszulösen.

Tabelle 18: Zytotoxischer Effekt von N-acylierten Ketosphingosinen und Sphingosinen gegen PC 12 und HEP G-2

Eintrag	Produkt	LD _{50(24h)} (µM)	
		HEP G-2	PC 12
1	91a	175	>200
2	91b	180	>200
3	91c	65	70
4	93a	80	>200
5	93c	30	30

Die gemessenen Viabilitätswerte (80 μ M C₂Cer induzieren die Apoptose von 50% der HEP G-2 Zellen) in Übereinstimmung mit der Literatur gelten auch als Test für dieses Zellkultursystem. Bei Vergleich der Messwerte im Bezug auf Verbindung **93a** gegen die Zelllinie PC 12 wurden ähnliche Ergebnisse erhalten. Das neu synthetisierte Sphingosin **93c** zeigte höhere Zytotoxizitätswerte sowohl gegen HEP G-2 (LD₅₀= 30 μ M) als auch gegen PC 12 (LD₅₀= 70 μ M) (Abb.89 und Abb. 90). Die nicht reduzierten Produkte in Tabelle 16 zeigten schwächere zytotoxische Effekte als die Verbindungen **93a** und **93c** (Abb. 89 und Abb. 90).

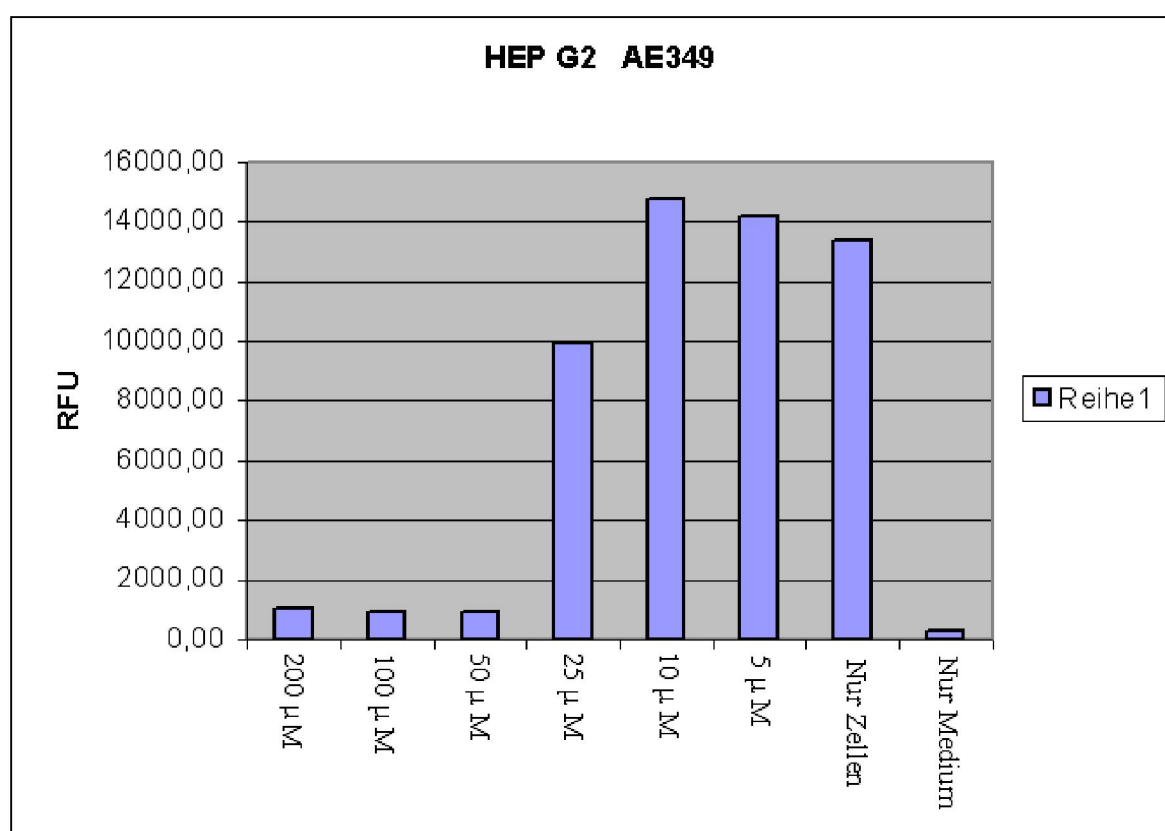


Abbildung 89: Zytotoxischer Effekt der Struktur **93c** gegen HEP-G2 bei verschiedenen Konzentrationen nach 24h unter Anwendung des Alamar Blue Assays.

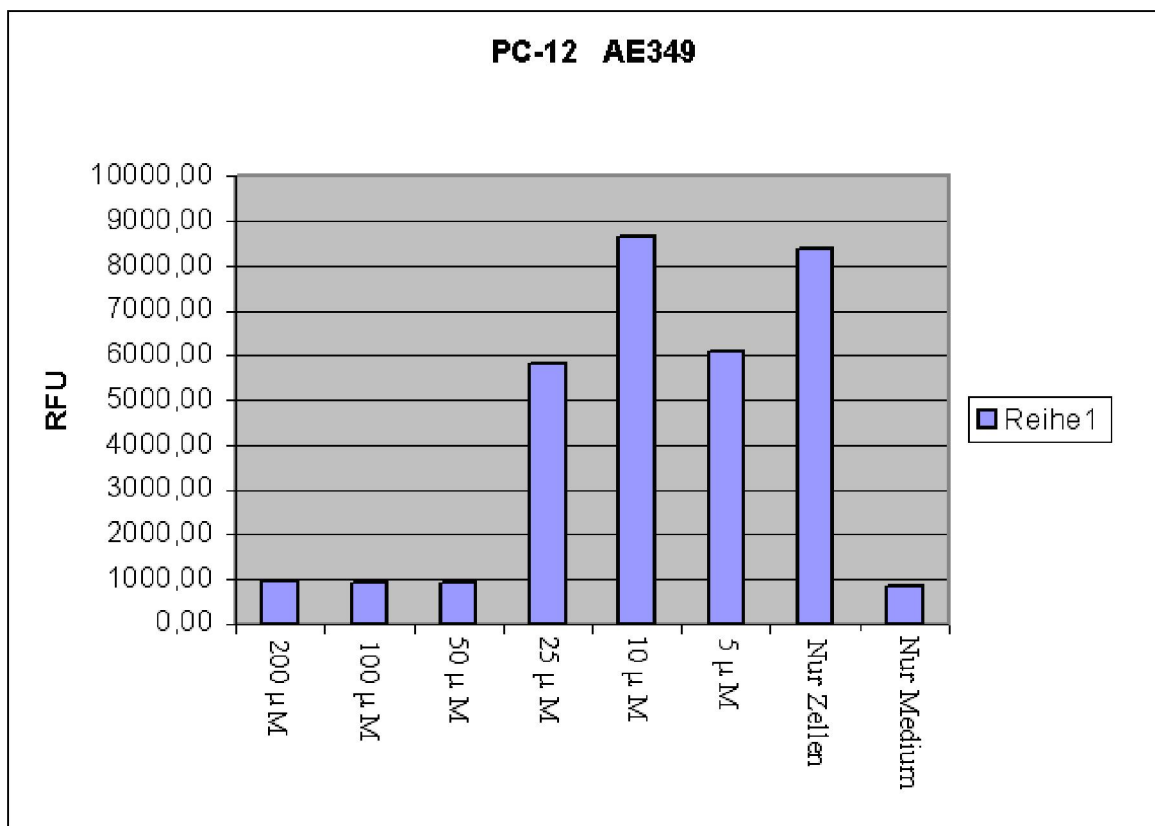


Abbildung 90: Zytotoxischer Effekt der Struktur **93c** bei verschiedenen Konzentrationen nach 24h unter Anwendung des Alamar Blue Assays.

4.6.4 Synthese von aromatenflankierten *N*-acylierten Sphingosinen

Im Rahmen dieser Dissertation sind Vorarbeiten zur Synthese von aromatenflankierten *N*-acylierten Sphingosinen **97**, **98** geleistet worden. Der langkettige unpolare Rest vom Ceramid wurde durch aromatische Ringe ersetzt. Damit wird die Löslichkeit solcher Verbindungen erhöht und ein besserer zytotoxischer Effekt erwartet. In naher Zukunft werden die bereits synthetisierten Verbindungen **97** und **98** und die reduzierte Form davon **100** und **101** gegen verschiedene Tumorzelllinien auf ihren zytotoxischen Effekt getestet.

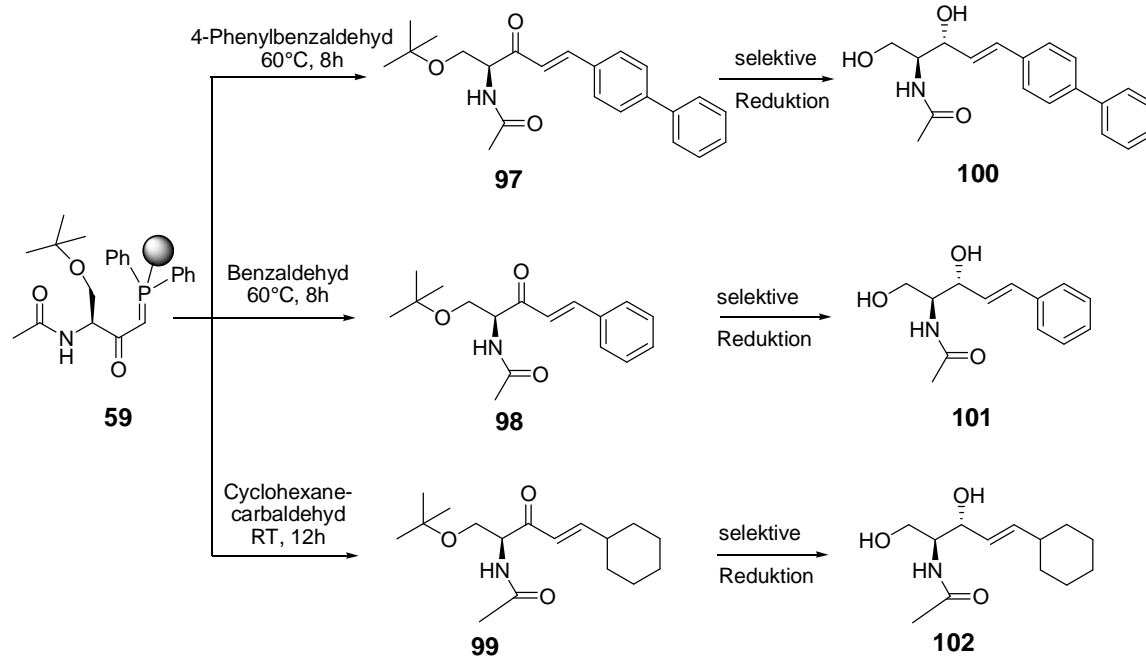


Abbildung 91: Konzept zur Synthese von aromatisch und Cyclohexan-flankierten Ceramiden.

Das Produkt **101** bewirkt effektiv die reverse Inhibition des axonalen Wachstums vom Hippocampal Neurons, die durch die Fumonisin B₁(FB₁) verursacht wird.^[141] Dies motiviert zur Untersuchung der in Abb. 91 dargestellten Produkte im Vergleich zum **101** haben.

Die Synthese der Strukturen ausgehend vom etablierten Synthesekonzept (Abb. 21) wurde erfolgreich durchgeführt.

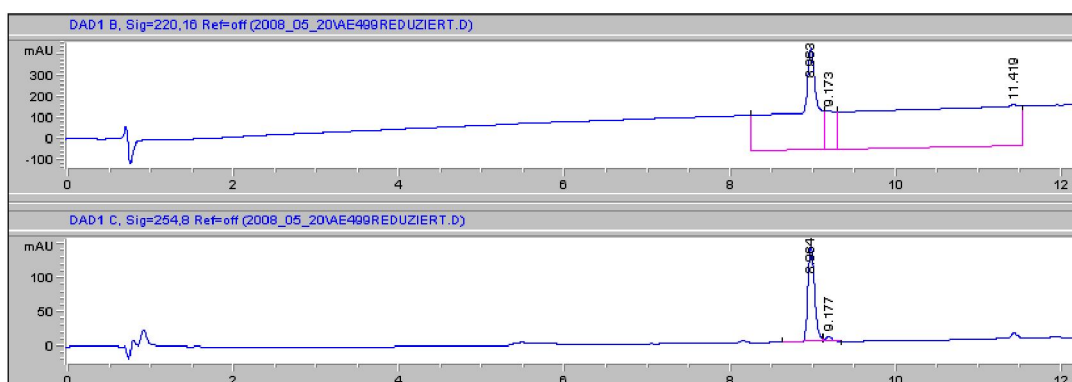


Abbildung 92: LC-MS-Spektrum vom aromatisch flankierten Ceramid **97**.

Die Produkte wurden mit LC-MS und NMR charakterisiert und werden in naher Zukunft selektiv reduziert.

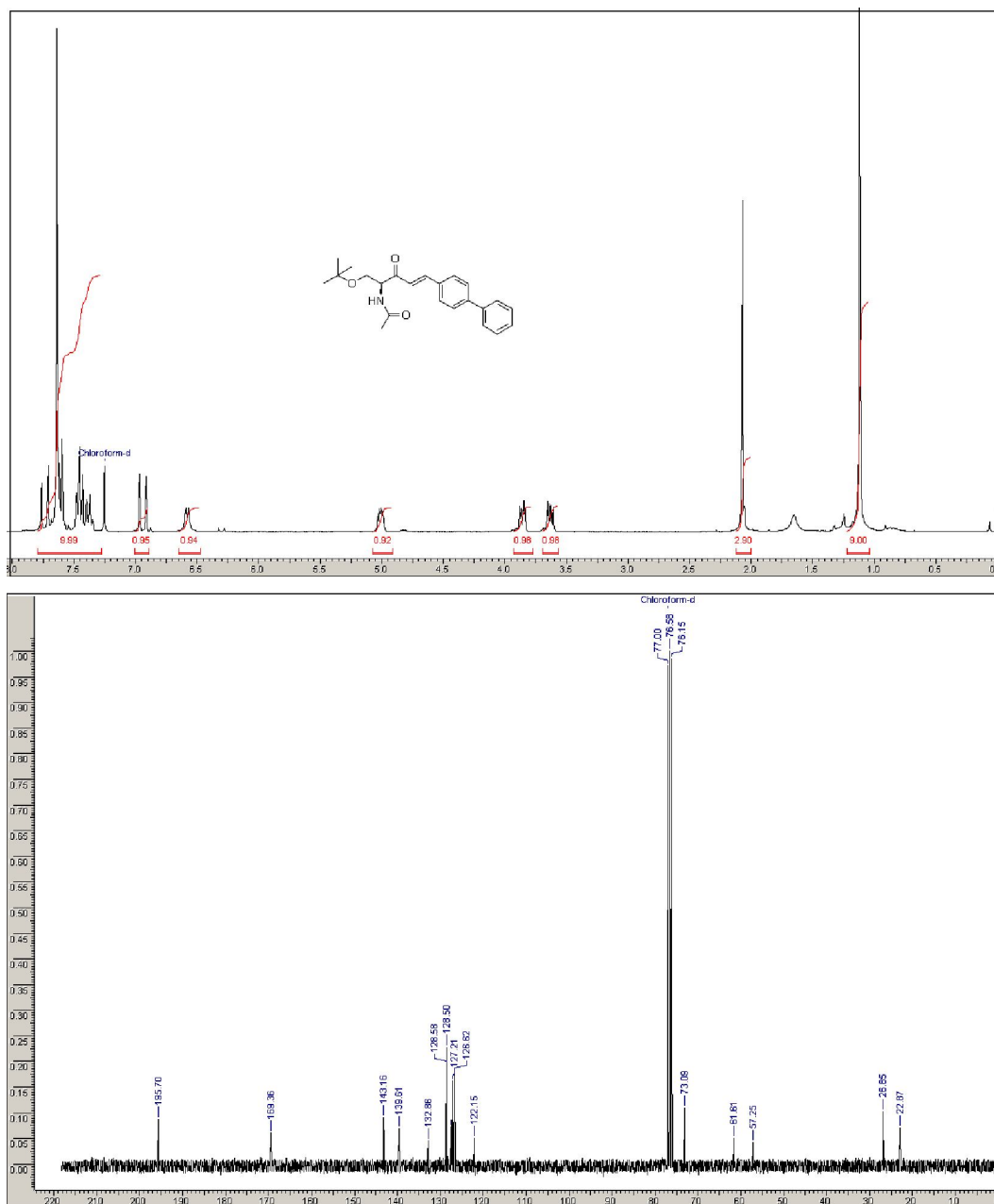


Abbildung 93: ^1H und ^{13}C -NMR vom Biphenyl-flankierten Ceramid 97.

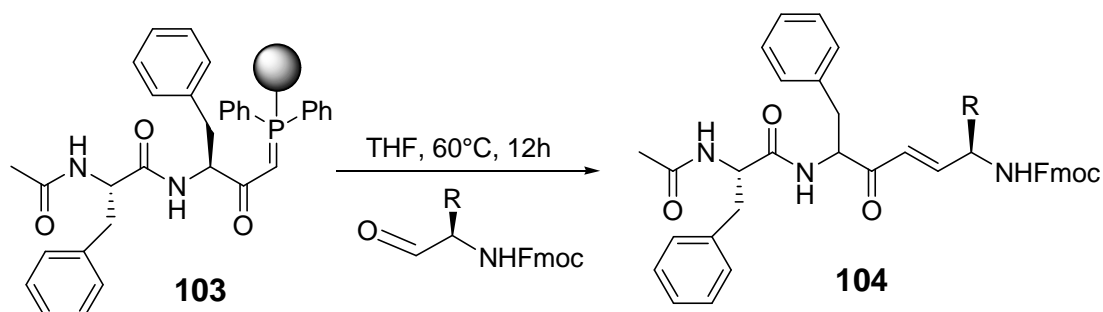
4.7 Diaminopentenone (**104**)


Abbildung 94: Konzept zur Synthese von Diaminopentenonen.

Das im Vorfeld etablierte Peptidyl-3-amino-2-oxo-1-phosphoranyliden-propan **103** wurde zur Synthese des bislang nicht literaturbekannten Peptidyldiaminopentenones **104** verwendet. Diese neue Strukturklasse könnte als Cysteinprotease-Inhibitoren aktiv sein. Die reduzierte Form ist als potentieller Aspartylprotease-Inhibitor zu testen. Zur Synthese von Diaminopentenonen wurden zwei verschiedene Aminosäurealdehyde über die Oxidation von den entsprechenden Aminosäurealkoholen mit Dess-Martin-Periodinan hergestellt. Der frisch synthetisierte Aminosäurealdehyd wurde in trockenem THF gelöst und zum Peptidylacylphosphoran **103** gegeben. Die Reaktion lief 12 h bei 60 °C unter Stickstoff. Das Produkt wurde abfiltriert und per LC-MS charakterisiert. Das Spektrum zeigte zwei Hauptpeaks. Der Hauptpeak bei 8.55 min ist dem Peptidylaldehyd zuzuordnen. Der zweite Peak bei 11.7 min war dem Produkt zuzuordnen. Die Produkte konnten problemlos präparativ gereinigt und per LC-MS charakterisiert werden. Mit der Charakterisierung des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums konnte das epimerisierte Produkt festgestellt werden.

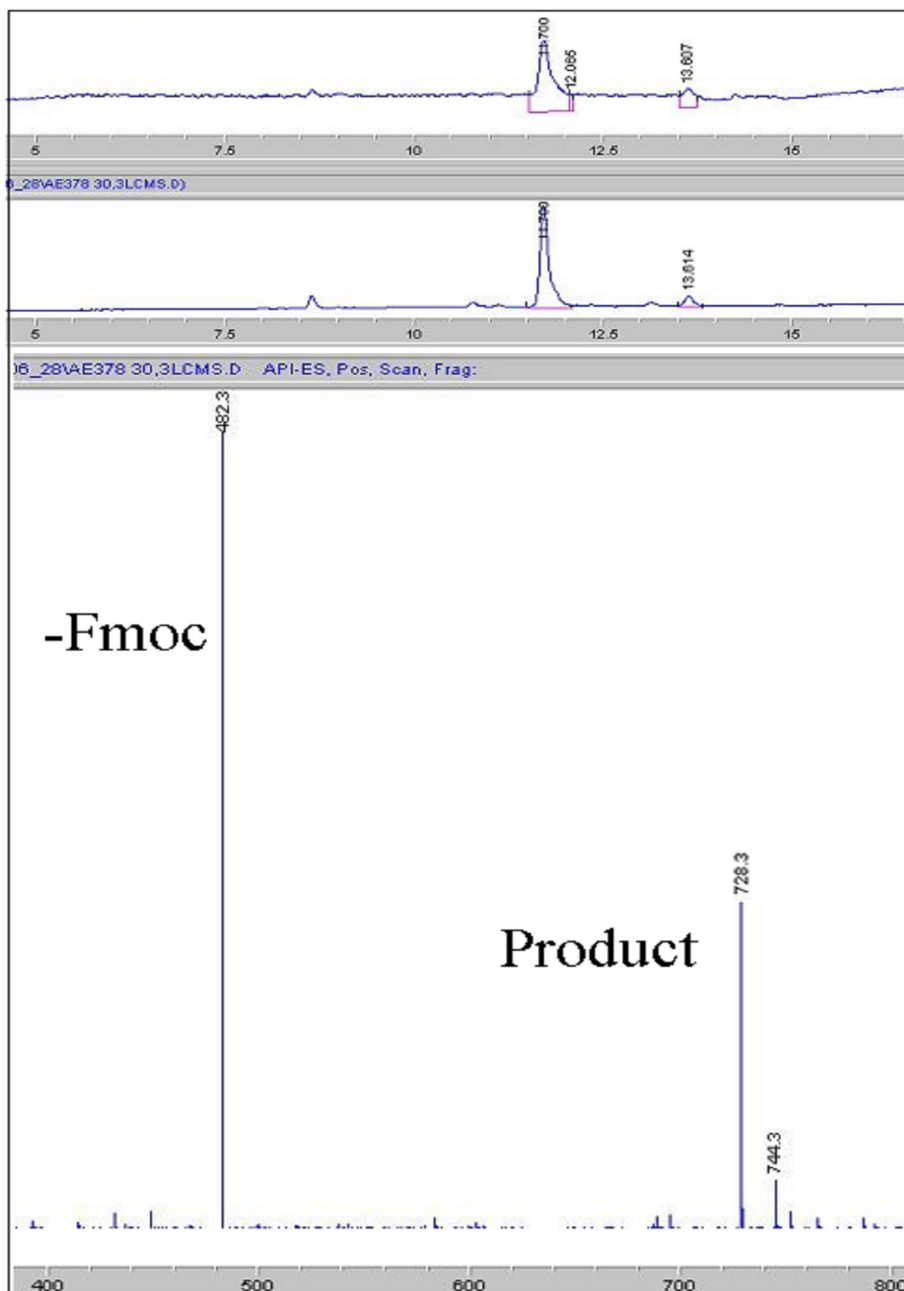


Abbildung 95: LC-MS vom gereinigten Diaminopentenon **104a**.

Als nächstes Ziel werden die beiden synthetisierten Produkte **104a** und **104b** in naher Zukunft zur Synthese von Peptidheterozyklen verwendet. Eine weitere Möglichkeit ist die Sequenz am C-Terminus zu verlängern.

Tabelle 19: Diaminopentenone über die Wittig-Abspaltung am Peptidylphosphoran mit Aminosäurealdehyden.

Produkt	Struktur	Ausbeute ^[a]
104a		46 %
104b		41 %

[a] Ausbeute nach der Reinigung

4.8 Festphasensynthese von Peptidyl diketonen (**106**)

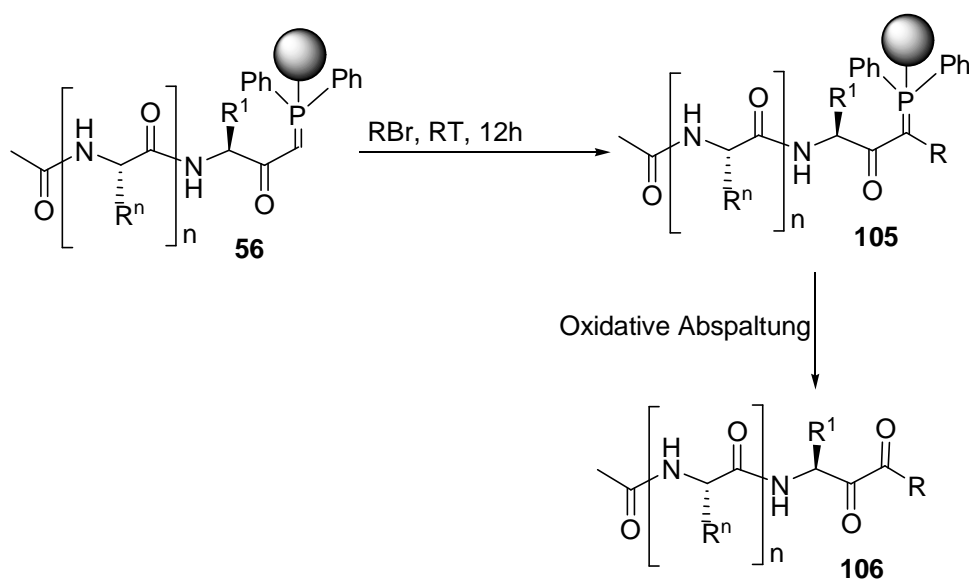


Abbildung 96: Festphasensynthesekonzept zur Herstellung von Peptidyl diketonen.

Peptidyl diketone **106** sind biselektrophile Verbindungen, die als Cystein, aber auch als Serin-proteaseinhibitoren von biologischer Relevanz sein können. Nichtpeptidische 1,2-Diketone gelten auch als relevante Ausgangsstufe in der organischen Synthese für die Darstellung einer Reihe von Heterozyklen wie z. B. Imidazole.^[142,143] Die Herausforderung bei dieser Arbeit war die Synthese einer Modellverbindung von Peptidyl diketon **106** ausgehend vom Synthesekonzept in Abb. 21 ohne Razemisierung der Stereozentren zu entwickeln.

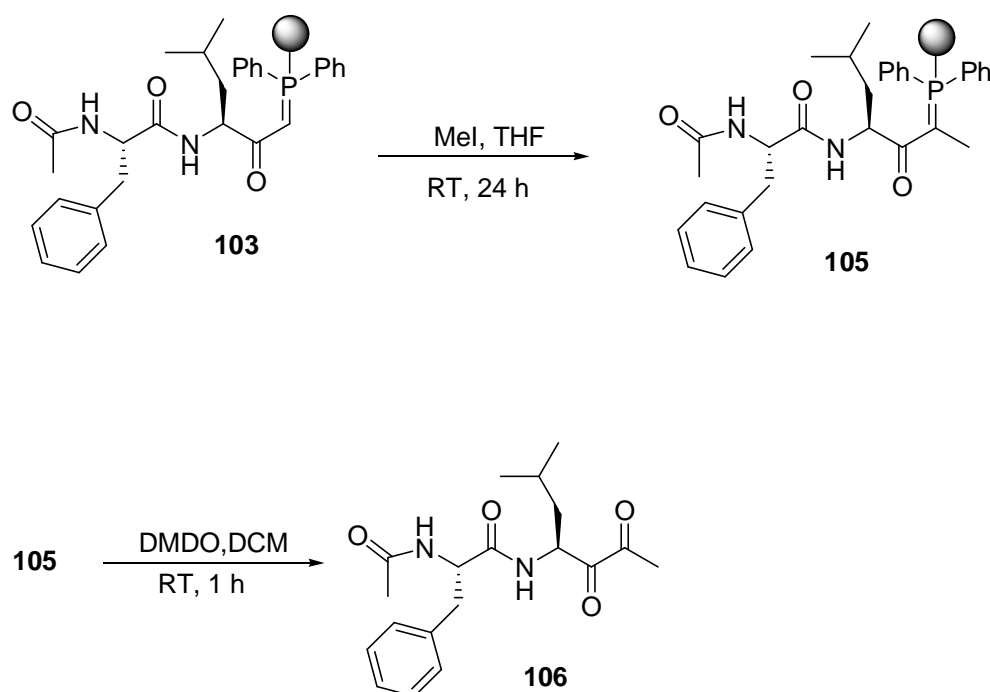


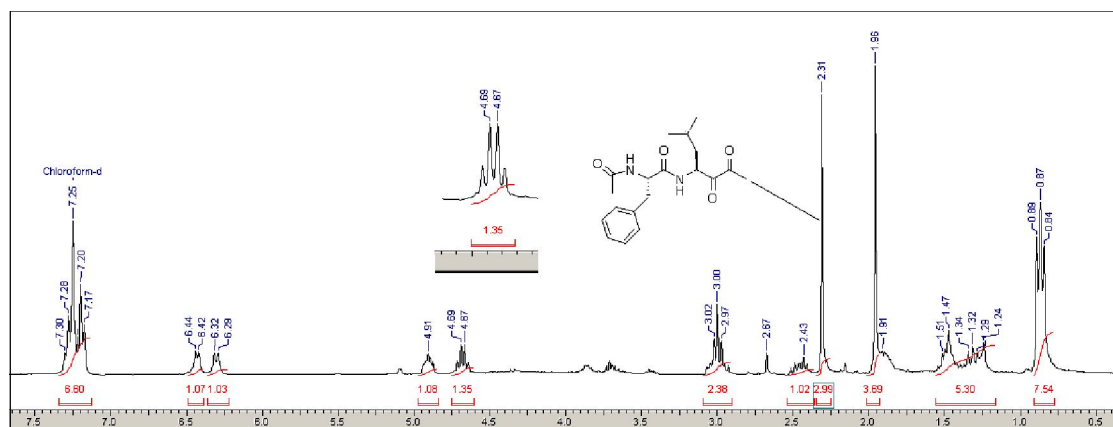
Abbildung 97: Alkylierung mit MeI und anschließende oxidative Abspaltung mit DMDO.

Die Synthese von Verbindung **103** erfolgte analog (Kap. 4.2). Die Alkylierung der Modellverbindung **103** mit Methyljodid zur Synthese von **105** wurden unter verschiedenen Reaktionsbedingungen in Parallelsynthese durchgeführt (Tab. 20).^[144]

Tabelle 20: Verschiedene Reaktionsbedingungen zur Alkylierung von **103**.

Eintrag	Reaktionsbedingungen	Reinheit	Ausbeute
1	(2 eq.) MeI, THF, 24h, RT	90 %	75 %
2	(2 eq.) MeI, Toluol, 24, RT	95 %	73 %
3	(2 eq.) MeI, THF, 30 min, 80°C, MW	80 %	69 %

Die Alkylierung wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden einmal in THF (Tab. 20, Eintrag 1) und einmal in Toluol (Tab. 20, Eintrag 2) durchgeführt, um den Effekt der Lösungsmittel auf die Ausbeute zu untersuchen. Mit THF quillt das Harz etwas weniger als mit Toluol, trotzdem war die Ausbeute (75%) etwas höher als mit Toluol (73%). Bei einem dritten Ansatz wurde die Alkylierung bei 80°C für 30 Minuten in THF in der MW durchgeführt, um die Reaktionszeit zu optimieren. Bei der Mikrowellen-Reaktion war sowohl die Ausbeute als auch die Reinheit etwas geringer (Tab 20, Eintrag 3). Die Abspaltung der Produkte vom Harz erfolgte unter oxidativen Bedingungen mit frisch vorbereitetem DMDO. Der Vorteil der milden oxidativen Abspaltung mit DMDO ist, dass das restliche DMDO über die Evaporierung entfernt werden kann.


Abbildung 98: $^1\text{H-NMR}$ vom Rohprodukt **106**.

Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie konnte nachgewiesen werden, dass die Synthese von allen drei Ansätzen vollständig razemisierungsfrei durchgeführt wurden. Im ^1H -NMR (Abb. 98) ist ein Singulett bei 2.31 ppm für die drei Protonen des Methylketons zu sehen, und bei 4.67-4.69 ppm ist statt ein Dublett-Dublett die typische vergrößerte Aufspaltung für das Proton des Stereozentrums des Acylierungsschrittes zu beobachten. Leider war die synthetisierte Menge vom Produkt nicht genug um ein ^{13}C -NMR zu messen. Dieses Projekt (Abb. 104) kann in Zukunft erweitert werden durch die Alkylierung mit langkettigen Alkylhalogeniden, um andere Strukturklassen mit biologischer Relevanz zu synthetisieren (Abb. 99).

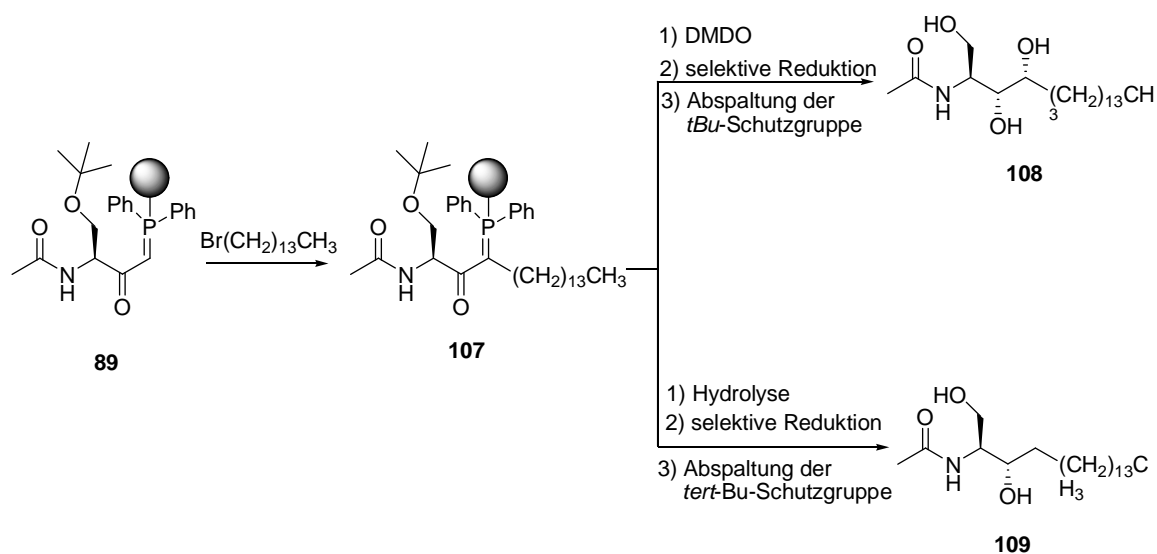


Abbildung 99: Mögliche Reaktionsschritte der Festphasensynthese von Sphinganinen **109** und Phytosphingosinen **108**.

Beispielweise führt die Alkylierung mit Bromotetradecan, Deprotonierung und anschließend die oxidative Abspaltung mit DMSO zu den biologisch relevanten Phytosphingosine **108**. Diese Verbindungsklasse wurde bis heute nur in der Lösung synthetisiert.^[145,146] Bei der Abspaltung über die Hydrolyse statt der oxidativen Abspaltung bekommt man Sphinganine **109** als Abspaltungsprodukt. Die Synthese dieser Verbindungsklasse an der festen Phase ist auch bis jetzt nicht literaturbekannt.^[147,148]

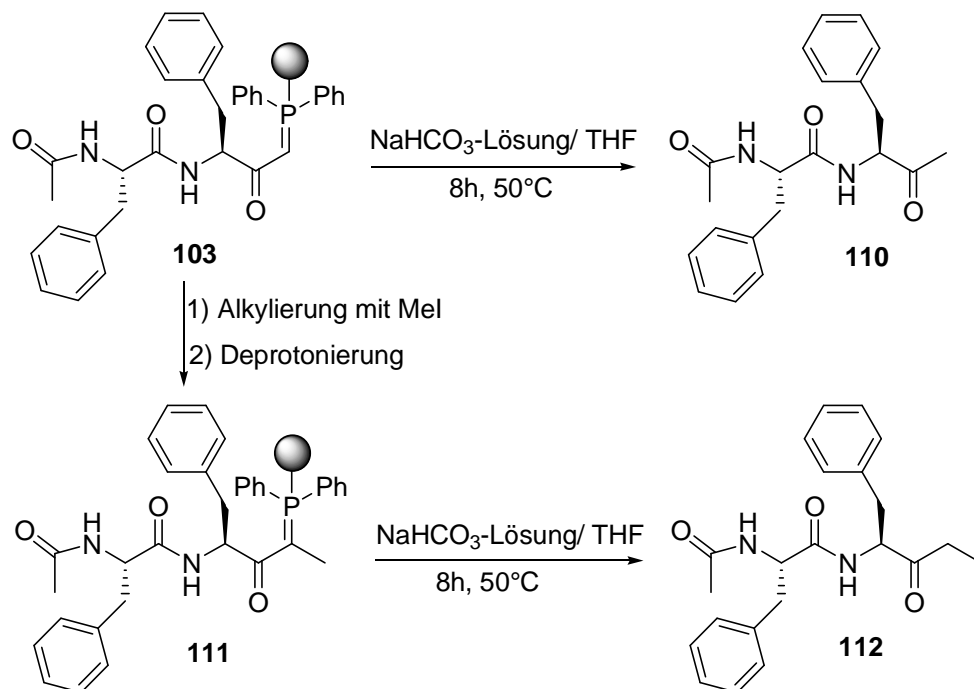
4.9 Peptidyl-methylketone und –ethylketone (**110**, **112**)


Abbildung 100: Konzept zur Festphasensynthese von Peptidylketonen **110**, **112**.

Eine weitere interessante Aufgabe im Rahmen dieser Arbeit war, die bislang nicht literaturbekannte vollständige Festphasensynthese von Peptidylketonen **110**, **112** ausgehend vom etablierten Konzept (Abb 22) zu optimieren. Peptidylketone sind literaturbekannt als Cysteinproteaseinhibitoren,^[149,150] und wurden als irreversible Inhibitoren gegen einige Enzyme wie Calpain I,^[151] Cathepsin B,^[152] Papain^[153] und Kathepsin K^[154] getestet. In zahlreichen Publikationen wird davon berichtet, dass die Potenz der synthetisierten Peptidylketone von der Variierung des Peptidylrestes an der P1 Position abhängig ist.^[155] Die Peptidylketone wurden bis jetzt über die klassische Lösungsmittelchemie synthetisiert, was die freie Variation an der P1 Position einschränkt. Wir glauben, dass unser Konzept den Weg zur Synthese von Peptidylketonen mit der freien Variation an der P1 Position ermöglicht.

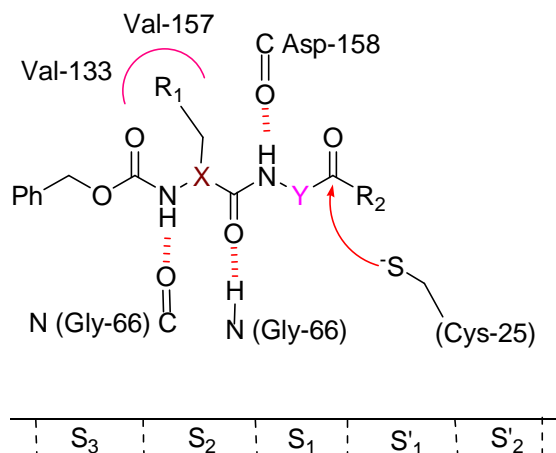
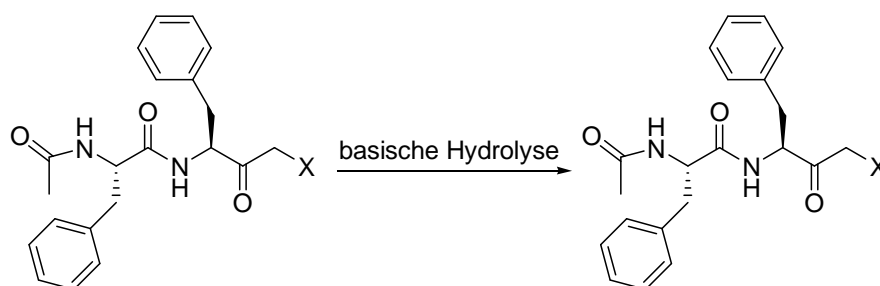


Abbildung 101: Schematische Darstellung zur Veranschaulichung der Bindung vom Peptidylketoninhibitor in der Papain Aktivtasche; hergeleitet vom X-ray Kristallographische Struktur des inhibierten Enzym mit **Z-Phe-Gly-CH₂-Cl**.^[129]

Um die Peptidylketone über unser Synthesekonzept zu erhalten, wird zunächst die Ausgangsverbindung analog (Kap. 3.2) hergestellt. Produkt **110** wurde vom Harz über die Hydrolyse abgespalten und Produkt **112** wurde über die Alkylierung und die anschließende Hydrolyse erhalten. Entscheidend bei der Optimierung ist die Durchführung der Abspaltung über die Hydrolyse ohne dass die Produkte **110** und **112** razemisieren. Es wurde in der Literatur wenig über die saure und über die basische Hydrolyse an Triphenylphosphinverbindungen berichtet. Die bis jetzt bekannten Basen, die in der basischen Hydrolyse verwendet werden wie Natriumhydroxid.^[156,157] oder Natriummethanolat,^[158,159] sind für die Abspaltung über eine basische Hydrolyse unserer Peptidylketonen vom Harz ungeeignet. Solche starke Basen führen zur Razemisierung der Stereozentren des Peptidylrestes. In einer einzigen Literaturstelle wurde über die Hydrolyse nur mit Wasser berichtet.^[160] Die Reaktion der Hydrolyse in Anlehnung an die letztgenannte Literaturstelle mit Wasser/THF blieb leider ohne Hydrolyseprodukt. Um die Razemisierung der Stereozentren zu vermeiden wurde die basische Hydrolyse mit einer Reihe von zur Verfügung stehenden Basen (Tab. 21), die relativ mild sind, bei Raumtemperatur untersucht. Ein weiterer Einsatz wurde mit katalytischen Mengen an Natriumhydroxid (0.1 eq.) durchgeführt (Tab. 21, Eintrag 7). Es wurde stündlich Massen von allen Ansätzen gemessen jedoch wurden keine nennenswerte Produktbildung erzielt. Bei der Erhöhung der Temperatur auf 50°C und bei einer Reaktionszeit von 8 Stunden konnte leider kein Ergebnis bei der Anwendung von DIPEA, Et₃N, (0.1 eq.) NaOH, oder

KHCO_3 als Basen erzielt werden. Erst beim Einsetzen von NaHCO_3 -Lösung/THF bei 50°C war die basische Hydrolyse erfolgreich (Tab 21, Eintrag 1, und 2). Die LC-MS-Analytik zeigte hohe Reinheiten von über 90% der Produkte **110**, **112**. Die Ausbeuten nach der präparativen Reinigung sind mit den Literaturangaben vergleichbar. Längere Reaktionszeiten erhöhen die Ausbeuten aber auch die Möglichkeit der Razemisierung.

Tabelle 21: Optimierung der basischen Hydrolyse mit milden Basen.



Eintrag	Reaktionsbedingungen	X	Reinheit ^[a]	Ausbeute ^[b]
1	$\text{NaHCO}_3/\text{H}_2\text{O}$, THF, 50°C , 8h, (pH-Wert=9)	Me	90 %	38 %
2	$\text{NaHCO}_3/\text{H}_2\text{O}$, THF, 50°C , 8h, (pH-Wert=9)	H	95 %	45 %
3	$\text{KHCO}_3/\text{H}_2\text{O}$, THF, 50°C , 8h, (pH-Wert=9)	Me	50 %	>5 %
4	$\text{KHCO}_3/\text{H}_2\text{O}$, THF, 50°C , 8h, (pH-Wert=9)	H	60 %	10 %
5	DIPEA(3eq.)/ H_2O , THF, 50°C , 8h, (pH-Wert=9)	H	>5 %	0 %
6	Et_3N (3 eq.)/ H_2O , THF, 50°C , 8h, (pH-Wert=9)	H	>5 %	0 %

[a] Reinheit vom Rohprodukt, [b] Ausbeute nach der chromatographischen Reinigung.

Tabelle 21: Fortsetzung

Eintrag	Reaktionsbedingungen	X	Reinheit	Ausbeute
7	NaOH (0.1 eq.)/ H ₂ O, THF, 55°C, 8h, (pH-Wert=9)	H	>5 %	>5 %
8	KOSi(Me) ₃ , THF, rt, 8h, (pH-Wert=12)	H	0 %	0 %
9	N+(Bu) ₄ OH ⁻ , MeOH, rt, 8h, (pH-Wert=12)	H	0 %	0 %

Die Auswertung der ¹H-NMR-Spektren von den Produkten (Tab. 21, Eintrag 1, und 2) zeigte, dass die Abspaltung über die basische Hydrolyse nicht razemisierungsfrei ist. Bei 2.02 ppm-2.04 ppm sind zwei Singulets statt einem Singulett der Methylgruppe am C-Terminus mit dem Verhältnis (1:3) zu beobachten, und von den Protonen der Amine sind je zwei Dubletts zu beobachten mit dem Verhältniss (1:3), was auf die Razemisierung hinweist. Die sehr ähnliche Verschiebung der beiden Protonen auf der Skala 4.60 ppm bis 4.72 ppm erschwert die direkte Beobachtung der Razemisierung an den Stereozentren.

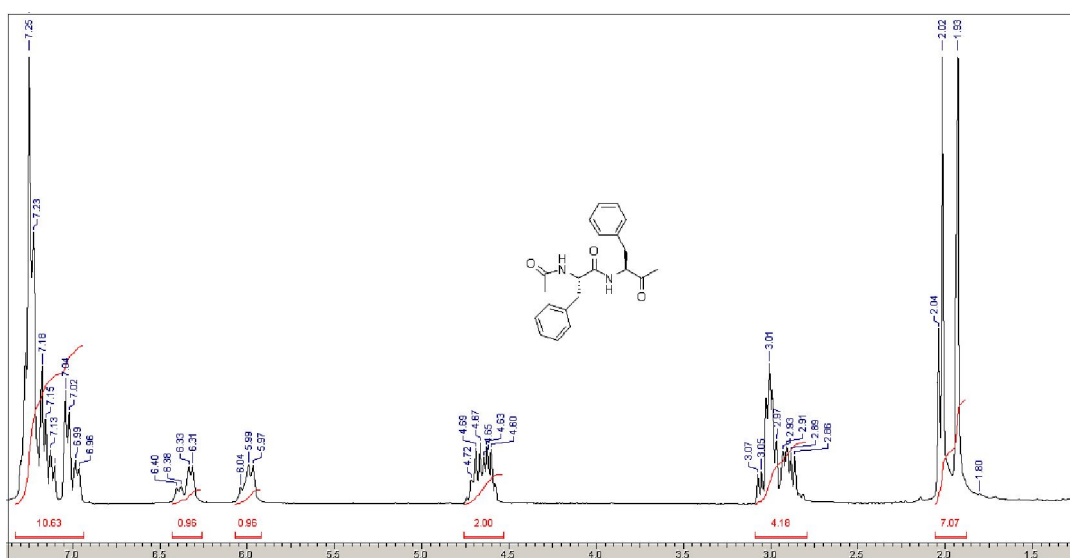


Abbildung 102: ¹H-NMR des entstandenen Produktes **110** über die basische Hydrolyse mit NaHCO₃/H₂O/THF.

Die auftretende Razemisierung, aber auch die Unbegeisterung für die Verwendung von Wasser bei der hydrolytischen Abspaltung des Produktes vom Harz ließ uns nach einem anderen Weg suchen. Eine attraktive Alternative schien die nukleophile Abspaltung ohne den Einsatz von Wasser. Die Anwendung von den nukleophilen Reagenzien KOSiMe_3 ^[161] (Tab. 21, Eintrag 8) und $\text{N}^+(\text{Bu})_4\text{OH}^-$ (Tab. 21, Eintrag 9) war jedoch ergebnislos. Außerdem sind beide Reagenzien viel zu basisch (pH-Wert = 12). Bei diesem Teil der Arbeit musste weiter nach einem Reagenz gesucht werden, welches eine razemisierungsfreie Abspaltung vom Harz garantiert. Die Möglichkeit der saueren Hydrolyse muß noch erforscht werden. Der Einsatz von Essigsäure bzw. anderen milden Säuren unter mässigem Erhitzen (50°C) kann zum Zwischenprodukt **113** führen. Das Zwischenprodukt kann dann mit Wasser behandelt werden, was zum Produkt **110** führen kann.^[162,163]

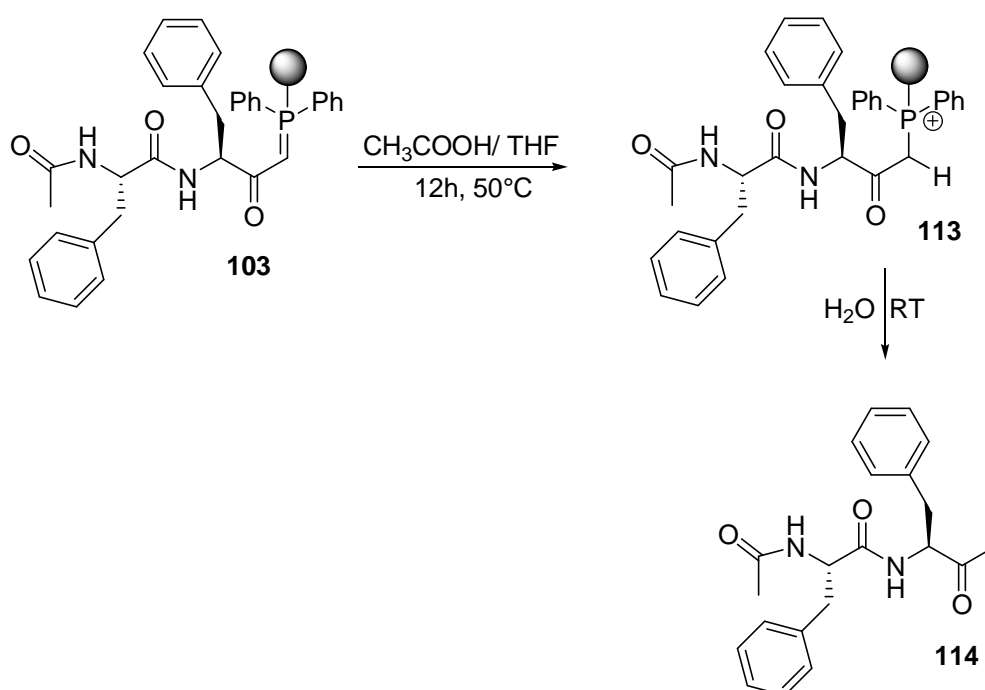


Abbildung 103: Mögliche Abspaltung zum Peptidylketon über die saueren Hydrolyse.

Die erfolgreiche Vervollständigung dieses Projektes wird den Weg für die Synthese von verschiedenen Peptidylketone mit der freien Variierung der Substituenten am C-Terminus eröffnen. Das ist bei der Untersuchung der Verbindungsklasse als Cysteinprotease Inhibitor sehr entscheidend.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die breite Verwendung von dem polymergebundenen Carbanionen-Äquivalent **52** bei der Synthese von Peptidyl- α,β -Diketoester **55** - α -Ketoaldehyd **57** und - α,β -ungesättigten Ketonen **58** erfolgreich gezeigt.

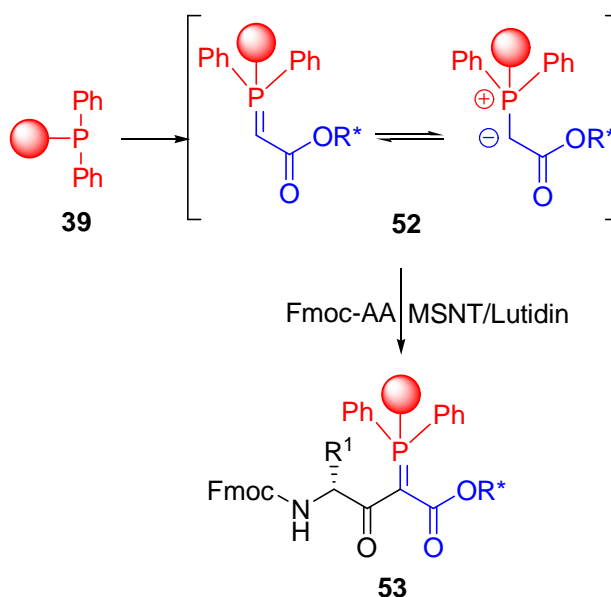


Abbildung 104: Milde C-Acylierung am Carbanionen-Äquivalent **52**.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Modifikation der synthetisierten Modellverbindungen am C-terminus zu Peptidflankierten Heterozyklen. Diese Modifikation führt zur Einschränkung der konformativen Freiheit der zu synthetisierenden Peptidmimetika, was deren biologischen Potenz erhöhen kann. Es wurden z.B. ausgehend von den biselektrophilen α,β -ungesättigten Ketonen Peptidyloxirane -pyrazoline -pyrazole -isoxazole -diazepine und -thiazepine synthetisiert.^[2] Peptidylchinoxazoline wurden sowohl ausgehend von den Peptidyl- α -Ketoaldehyd **57** als auch von den Peptidyl- α,β -Diketoestern **55** hergestellt.

Weiterhin kommt den Peptidyl- α -ketoaldehyden **57** große Bedeutung bei der Synthese des Diaminopropanolisosters **71** zu, welches ein wichtiges Strukturmotiv von Inhibitoren der Aspartylproteasen ist. Die synthetisierten Diaminopropanolisostere **71** entstanden durch die reduktive Aminierung der Peptidyl- α -ketoaldehyde **57** mit einem festphasengebundenen Dipeptid **69**. Anschließend wurde das Keton zum Alkohol mittels

NaBH₄ reduziert. Das resultierende Produkt ist ein Diastereomerengemisch im gleichen Verhältnis.

Die erfolgreiche Anwendung des Konzeptes wurde im Rahmen einer internen Zusammenarbeit an der Synthese von Peptidyl- α -ketoaldehyden **57** mit den entsprechenden Erkennungssequenz der Cysteinprotease Caspase-3 demonstriert. Die synthetisierten α -Ketoaldehyde **73a**, **73b** wurden als Sonden für die zielgerichtete Identifizierung inhibitorischer Fragmente aus einer in unserem Institut vorhandenen Bibliothek eingesetzt. Basierend auf meinem Konzept wurde ein weiterer Peptidyl- α -ketoaldehyd **78** mit der entsprechenden Sequenz für die Sortasetranspeptidase synthetisiert. Im Rahmen einer Kooperation mit der AG Beyermann (FMP) wurde der Inhibitor in einem HPLC basierendem Assay getestet und zeigte ähnliche inhibitorische Aktivität wie bislang bekannte Inhibitoren.

Eine noch größere Bedeutung bekam das Carbanionen-Äquivalent **52** durch dessen Anwendung zur ersten Festphasensynthese von *N*-acylierten Ketosphingosinen und deren stereoselektiven Reduktion zu den *N*-acylierten Sphingosinen **93**. Die Synthese erfolgte durch die milde C-Acylierung mit Fmoc-Serin am Linkerreagenz Acylphosphoran **52**. Nach erfolgter Fmoc-Abspaltung, und anschließender Acetylierung am freien Amin wurden verschiedene Ketosphingosinderivate durch die Entschützung der eingeführten Esterschutzgruppe und die anschließende Wittigabspaltung mit verschiedenen Aldehyden erhalten. Die selektive Reduktion der Carbonylgruppe der Ketosphingosinderivate wurde mit den Literatur-bekanntem Reduktionsmitteln L-Selectride, Zn(BH₄)₂, DIBAL-H und NaBH₄ untersucht. Durch die Anwendung von LiAlH(O-*t*Bu)₃ wurde das Keton selektiv reduziert ohne das Olefin zu reduzieren. Die Zytotoxizität der synthetisierten Produkte wurde gegen verschiedene Zelllinien wie HEP G-2, PC 12, und HL-60 unter Anwendung des Alamar Blue Assays getestet. Ein Teil der synthetisierten *N*-acetylierten Sphingosine zeigten eine deutlich bessere biologische Aktivität, als die bisher bekannten *N*-acetylierten Sphingosine. Die Verbindungen können nun zum besseren Verständnis des mechanistischen Verlaufes der Apoptose verwendet werden. Darüber hinaus ist es gelungen, die bis jetzt nicht literaturbekanntem Diaminopentenone **104** zu synthetisieren. Die Synthese erfolgte über die Wittigabspaltung mit selbst synthetisierten Aminosäurealdehyden am Peptidyl-3-amino-2-oxo-1-phosphoranyliden propan **56**. Diese neue Strukturklasse und die reduzierte Form davon sind als potenzielle Cysteinproteaseinhibitoren zu prüfen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass das Synthesekonzept ausgehend vom Produkt **56** zur Synthese von weiteren Peptidelektrophilen wie Peptidylmethylketonen **110** und -diketonen **106** geeignet ist. Das Peptidyldiketon **106** wurde durch Alkylierung am Peptidylphosphoranharz mit Methyljodid und anschließender oxidativer Abspaltung mit frisch hergestelltem DMDO ohne Razemisierung der Stereozentren erhalten. Das Konzept ermöglichte auch den Zugang zu Peptidylketonen über die basische Hydrolyse mit $\text{NaHCO}_3/\text{H}_2\text{O}$ -Lösung. Das erhaltene Produkt war ein Enantiomeregemisch im Verhältnis 4:1. Solche Strukturen sind als Cysteinproteaseinhibitoren bekannt, und waren relativ einfach über das Konzept zu synthetisieren. Die bis jetzt erzielten Ergebnisse inspirieren zur Synthese von maßgeschneiderten Peptid-Heterozyklen, um detailliertes konformationelles Verständnis zu bekommen. Als weiteres Zukunftsziel wird die weitere Anwendung der Peptid-elektrophilen als bioaktiven Verbindungen für verschiedene Protease-targets betrachtet. Vielmehr können die Peptid-biselektrophilen als Sonden für die dynamische Ligation verwendet werden.

Summary

A new polymer-supported 2-phosphoranylidene acetates **52** (denominated as “linker reagents”) was established, that allows the free variation of substituents in all relevant positions of the core structure including the P1 site chain, that addresses the S1-pocket of the proteases.

C-Acylation of polymer-supported 2-phosphoranylidene acetates **52** on polymeric support are introduced as a flexible entry point to the C-terminal variation of carboxylic acids. Conditions for the efficient acylation of the phosphoranes with protected amino acids and the subsequent derivatization of the obtained 2-acyl-2-phosphoranylidene acetates **53** were investigated. Several alternative cleavage conditions were established: Oxidative cleavage yielded peptidyl 4-amino-2,3-dioxo butanoates (peptidyl-2,3-Diketoesters) **55**; saponification on the polymer support led via decarboxylation to the peptidyl-3-amino-2-oxo-1-phosphoranylidene propanes **56**. These intermediates could be cleaved either oxidatively with DMDO furnishing peptidyl-3-amino-2-oxo-propanals (peptidyl- α -ketoaldehydes) **57** or with by reaction with aldehydes yielding peptidyl-1-amino-3-buten-4-ones (peptidyl vinyl ketones) **58**. All obtained products are versatile intermediates for the C-terminal variation of carboxylic acids and peptides e.g. 1,5-diamino-3-hydroxy-propane transition state analog **71**, peptidyl-pyrazolines **82**, -pyrazoles **83**, -isoxazoles **84**, -epoxides **88**, diazepines **85**, and -thiazepines **86**.

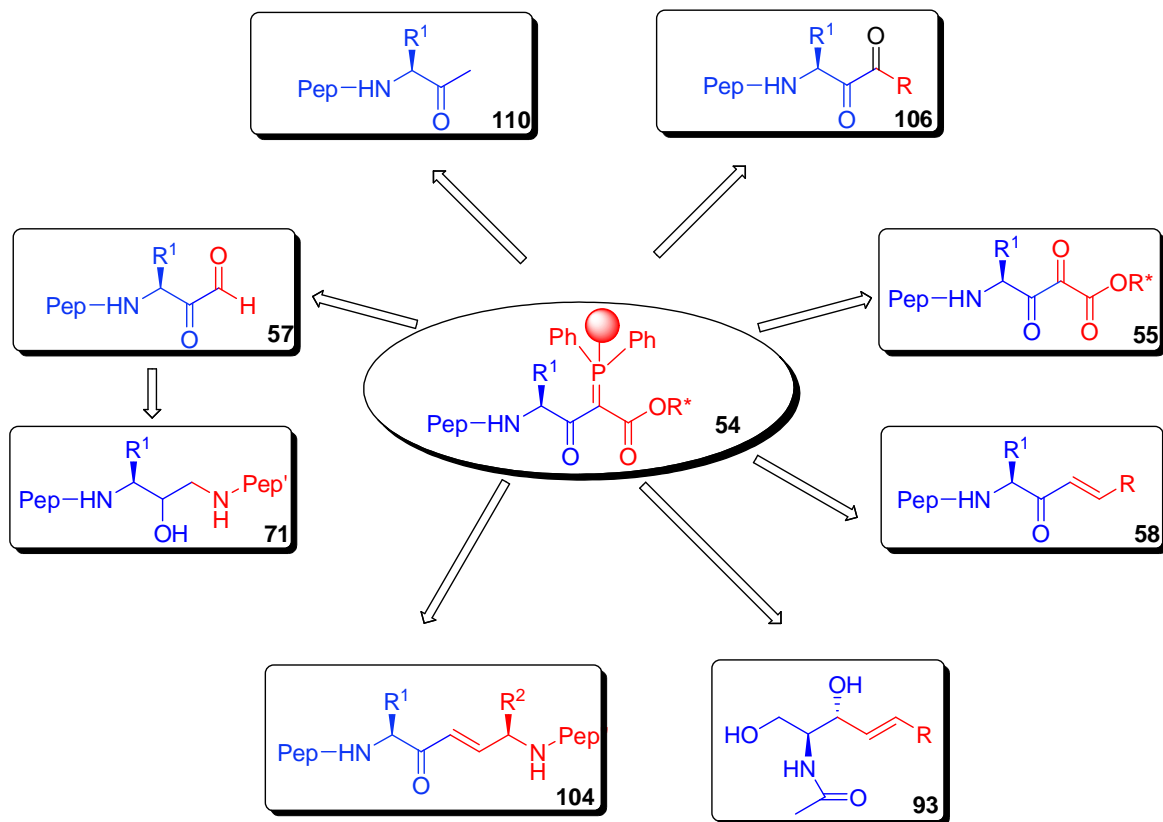


Abbildung 105: Diversitätsorientierter Synthesekonzept zur Synthese von Proteaseinhibitoren und Ceramiden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Die Lösungsmittel wurden von Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Lancaster (Mühlheim am Main), Acros (Ulm) und Aldrich (Taufkirchen) in p.a. Qualität bezogen. Die wasserfreien Lösungsmittel DMF, DCM, THF, Methanol, Toluol wurden von Fluka (Neu-Ulm) bezogen. Acetonitril und Methanol zur HPLC- sowie MS-Analytik wurden in LiChrosolv[®] Gradient Grade Qualität von Fisher Scientific (England) verwendet. Wasser für HPLC wurde über eine Milli Q-Biocel-Anlage A 10 der Fa. Millipore (Eschborn) gewonnen. Für die NMR-Spektroskopie wurden deuterierte Lösungsmittel der Firmen Merck (Darmstadt) und Deutero GmbH (Herresbach) verwendet. Trifluoressigsäure der Reinheit Uvasol stammte ebenfalls von der Firma Merck (Darmstadt). Harze wurden von den Firmen Fluka (Triphenylphosphin-Harz; Neu-Ulm) und PepChem (TCP-Harz; Tübingen) bezogen. Alle anderen Chemikalien und Reagenzien wurden von ABCR (Karlsruhe), Acros (Ulm), Aldrich (Steinheim), Bachem (Bubendorf, Schweiz), Fluka (Neu-Ulm), IrisBiotech (Marktredwitz), Lancaster (Mühlheim am Rhein), Merck (Darmstadt), Merckbiosciences/Novabiochem (Läufelfingen, Schweiz) und Senn (Dielsdorf, Schweiz) bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

6.2 Geräte und analytische Methoden

6.2.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Alle Dünnschichtchromatogramme wurden auf DC-PET-Folien-Kieselgel (Schichtdicke 0,25 mm, mittlerer Porendurchmesser 60 Å, 4 x 8 cm) mit Fluoreszenzindikator 254 nm der Firma Fluka durchgeführt. Die Verbindungen wurden mit UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) detektiert und mit Hilfe Mostain-Lösung (0.5g Cer[IV]-Sulfat $\times 4\text{H}_2\text{O}$, 25g $[\text{NH}_4]_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$, 28ml konz. H_2SO_4 , 471,25ml H_2O) entwickelt.

6.2.2 Infrarotspektroskopie (FT-ATR-IR)

FT-ATR-IR-Spektren wurden mit einem Bruker Vector 22/Harrick aufgenommen. Das Gerät ist mit einer SplitPea[®]-ATR-Einheit der Firma Harrick versehen. Harze und Verbindungen wurden direkt durch Aufpressen auf einen Zink-Selenid vermessen. Bei einem Meßbereich von 500-4000 cm⁻¹ wurden die Spektren mit 32 Scans aufgenommen, Background- und ATR-Korrektur erfolgten automatisch. Kohlendioxid-Absorptionsbanden wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit aus den Spektren entfernt.

6.2.3 Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC/MS)

Alle ESI/MS Spektren wurden aufgenommen an einer Agilent 1100 Series (Agilent Technologies). Die Ionisation erfolgte durch Electro-Spray-Ionisation (ESI).

Die Anlage ist mit einer analytischen Säule Macherey-Nagel C18, 100Å, 5µM, 4x 250 mm column Nucleodur.) ausgestattet. Für den analytischen Lauf wurde ein Gradient von Wasser/0,1% TFA (v/v) (Laufmittel A) und Acetonitril/0,1% HCOOH (v/v) (Laufmittel B) bei einer Flussrate von 0,3 ml/min gefahren. Sehr oft verwendete Gradient war : 5% B auf 100% B innerhalb 45 min. Die UV-Detektion erfolgte bei den Wellenlängen (λ = 220 nm, 254 nm) und die Reinheit der Produkte wurde anhand der Peakflächen errechnet. Eine absolute Gehaltsangabe ist jedoch aufgrund der unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten der Verbindungen nicht möglich.

6.2.4 Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS)

Die ESI-FTICR-MS-Messungen wurden an einem Ionspec QFT-7 (Varian), mit dem Z-Spray-ESI-Quelle (Micromass) durchgeführt. Die Fragmentierung erfolgte mittels IRMPD.

6.2.5 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Eindimensionale ¹H- und ¹³C- sowie zweidimensionale NMR-Spektren wurden an einem Bruker AV 300 MHz Spektrometer bzw. einem Bruker AVANCE 600 MHz Spektrometer (Bruker Analytik, Bremen) aufgenommen. Als Lösungsmittel wurden DMSO-d₆ oder CDCl₃ verwendet. Die Spektren wurden bei 25 °C aufgenommen. Die chemische

Verschiebung ist in ppm relativ zum jeweiligen Lösungsmittel oder TMS als internen Standard angegeben. Die Kopplungskonstante ist in Hertz(Hz) angegeben. Die Signalmultiplizitäten sind wie folgt abgekürzt: Singulett(s), Dublett(d), Triplett(t), Multipllett(m), breite Signale(br).

6.2.6 Mikrowellenunterstützte Synthesen

Die Mikrowellenunterstützten Synthesen wurden auf einem SmithSynthesizerTM der Firma Personal Chemistry, Uppsala, Schweden durchgeführt. Es handelt sich um ein Single-Mode Gerät, dessen Steuerung Software-unterstützt erfolgt. Das Probenvolumen beträgt 0,5-5 ml in mit Septen verschlossenen, druckstabilen Reaktionsgefäßen. Ein Magnetron mit einer Leistung von 15-300 W erzeugt Mikrowellenstrahlung bei einer Frequenz von 2,45 GHz. Der Temperaturbereich erstreckt sich von 60-250 °C bei einer Heizrate von 2-5 °C/min. Der zulässige Druck im Inneren der Reaktionsgefäße betrug 20 bar. Während der Reaktion wird die Temperatur im Reaktionsgefäß durch kurze Mikrowellenpulse konstant gehalten. Schnelles Abkühlen nach der Reaktion wird mit Druckluft erreicht.

6.2.7 Kaiser-Test

Die Vollständigkeit der Acylierungsreaktionen auf primäre Amine bei der Bildung von Peptidbindungen sowie der Hydrazon-Bildung an AP-Harz wurde mittels KAISER-Test (Nachweis primärer Amine mit Ninhydrin) untersucht.

Für den KAISER-Test wurden folgende Reagenzlösungen verwendet:

Lösung I: 50 µl einer 0,01 M wässrigen KCN-Lösung werden mit Pyridin auf 25 ml aufgefüllt.

Lösung II: 5 g Ninhydrin werden in 100 ml n-Butylalkohol gelöst.

Lösung III: 80 g Phenol werden in 20 ml n-Butylalkohol gelöst.

Zur Durchführung wurden wenige Harzkugeln in einem Eppendorf-Gefäß mit je einem Tropfen der drei Reagenzlösungen versetzt und die Suspension 5 min bei 110°C erhitzt. Sind freie Amino-Gruppen vorhanden, so tritt eine Blaufärbung der Lösung auf.

6.2.8 UV-spektrometrische Fmoc-Bestimmung zur Feststellung der Harzbelegung

Die UV-Spektren zur quantitativen Fmoc-Bestimmung wurden an einem (V-550) UV/VIS-Spektrometer von JASCO (Deutschland) aufgenommen.

Dazu wurden Proben (5-10 mg) des gewaschenen und getrockneten Harzes entnommen, exakt in einem 10 ml-Maßkolben eingewogen, mit 20 % Piperidin/DMF bis zur Eichmarke aufgefüllt und für ca. 30 min geschüttelt.

Am UV-Spektrometer wird im Wellenlängenbereich von 250-320 nm zunächst mit reinem Piperidin/DMF eine Hintergrundkorrektur durchgeführt und dann die Abspaltung gegen diese Referenz vermessen. Die Extinktionswerte an den drei Absorptionsmaxima des UV-Spektrums bei $\lambda_1 = 267$ nm, $\lambda_2 = 289$ nm und $\lambda_3 = 301$ nm werden nach folgender Gleichung ausgewertet:

$$x \left[\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right] = \frac{100000 \cdot E_\lambda}{\varepsilon_\lambda \cdot (\text{Einwaage})}$$

x = Harzbelegung

E_λ = Extinktion

ε_λ = Extinktionskoeffizient

(Einwaage) = Harzmenge in [mg]

Dabei wurden folgende Extinktionskoeffizienten verwendet:

$$\varepsilon_{267} = 17500 \text{ cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_{289} = 5800 \text{ cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_{301} = 7800 \text{ cm}^{-1}$$

Die Harzbelegung ergibt sich durch Mittelung über die drei bei den unterschiedlichen Wellenlängen berechneten Werte.

6.2.9 Präparative HPLC

Für die Reinigung der Produkte wurde die Anlage mit dem UV-Detektor (SDD-6A), Systemkontroller (SCL-8A), und dem Preparativ Liquid Chromatograph (LC.8A) der Firma

Schimadzu verwendet. Die verwendete Trennsäule für die präparative Reinigung ist eine Grom-SIL 300 ODS-5 ST RP-C₁₈ (10 µm, 250 x 20 mm).

6.3 Polymer-unterstützte Peptidylphosphorane

6.3.1 Synthese von 2'-trimethylsilyl-N-peptidyl-4-amino-3-oxo-2-phosphoranyliden-butylsäureester (**54**)

Alkylierung mit Bromessigsäure-(2-trimethylsilyl)ethylester am Triphenylphosphin-Harz **39 zum (Carboxylatmethylen)-triphenylphosphoniumbromid-Harz**

Triphenylphosphin-Harz **39** (0.5 g, 1.6 mmol/g, 0.8 mmol, 1 % Divinylbenzol, 100-200 mesh, Fluka) wird in ein MW-Vial eingewogen und in wasserfreiem Toluol (6 ml) suspendiert. Nach Zugabe von Bromessigsäure-(2-trimethylsilyl)ethylester (991.5 mg, 4 mmol, 5 eq.) wird das Reaktionsgefäß verschlossen und durch Mikrowellen für 15 min auf 100°C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wird das Reaktionsgefäß geöffnet, das Harz filtriert, mit wasserfreiem Toluol, DCM gewaschen (je 3 x) und im Vakuum getrocknet. Das Harz wird durch Elementaranalyse charakterisiert und durch das Einwiegen vor und nach der Reaktion die Ausbeute bestimmt.

EA: Br (9,25% Gehalt). Ausbeute 98%.

Deprotonierung von (Carboxylatmethylen)triphenylphosphoniumbromid-Harz zum polymer gebundenen 2-Phosphoranyliden acetat (52**)**

Das erhaltene (Carboxylatmethylen)triphenylphosphoniumbromid-Harz (0.8 mmol) wird in wasserfreiem DCM (5 ml) suspendiert und mit Triethylamin (558 µl, 4 mmol, 5 eq.) versetzt. Die Mischung wird 2 h bei RT geschüttelt, filtriert, mit DMF, THF und DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Harz wird durch EA und FT-ATR-IR charakterisiert.

EA: Br (0,0% Gehalt). Ausbeute 98%

IR (ATR): ν = 3059, 3025, 2926, 2851, 2149, 1731, 1599, 1492, 1451, 1437, 1256, 1185, 1111, 751, 698, 569, 517, 512.

C-Acylierung von 2-Phosphoranyliden acetat zum 2-Acyl-2-phosphoranyliden acetat (53)

2-Phosphoranyliden acetat **52** (0.8 mmol) wird in wasserfreiem DCM vorgequollen. In einem PP-Röhrchen werden die Fmoc-Aminosäure (4 mmol, 5 eq.), MSNT (4 mmol, 5 eq.) und Lutidin (3.6 mmol, 4.5 eq.) eingewogen und in 8 ml wasserfreiem DCM gelöst. Die Lösung wird zum Polymer gegeben und 12 h bei RT geschüttelt. Nach Filtration und gründlichem Waschen mit DMF, THF und DCM wird das 2-Acyl-2-phosphoranyliden acetat im Vakuum getrocknet und durch Fmoc-Bestimmung sowie FT-ATR-IR charakterisiert.

Ein Beispiel für die Acylierung mit Fmoc-Phe-OH

IR (ATR): $\nu = 3424, 3396, 3058, 3025, 2923, 2853, 1718, 1654, 1559, 1492, 1451, 1437, 1384, 1248, 1195, 1117, 1080, 835, 742, 723, 698, 613, 541$.

Standard-Fmoc-Peptidsynthese am Phosphoran-Linker und anschließende Acetylierung/Capping zum 2'-trimethylsilyl-N-peptidyl-4-amino-3-oxo-2-phosphoranyliden-butylsäureester (54)

Der Amino-Terminus des mit der ersten Fmoc-Aminosäure acylierten Harzes wird durch Behandlung mit 20 % Piperidin/DMF für (2 x) 6 min entschützt. Das Harz wird gründlich mit DMF, THF und DCM gewaschen und in wasserfreiem DMF geschüttelt. Die jeweilige Fmoc-Aminosäure (5 eq.) wird mit HOBt·H₂O (5 eq.) eingewogen, in DMF gelöst und mit DIC (5 eq.) versetzt. Nach 5 min Voraktivierung wird die klare Lösung zum Polymer gegeben und für 3 h bei RT geschüttelt. Nach Filtration und gründlichem Waschen mit DMF, THF und DCM wird das Harz getrocknet oder erneut der Amino-Terminus entschützt und die Prozedur mit der nächsten Aminosäure wiederholt. Die vollständige Umsetzung kann ab der zweiten, nach diesem Verfahren gekuppelten Aminosäure mit dem KAISER-Test überprüft werden (Kap. 6.2.7).

Nach Entschätzung des Amino-Terminus der letzten gekuppelten Aminosäure mit 20 % Piperidin/DMF wird das Polymer gründlich mit DMF, THF und DCM gewaschen und in wasserfreiem DMF geschüttelt. Anschließend wird mit wasserfreiem DMF/Ac₂O/DIPEA (8:1:1, v:v:v) versetzt und 2 Mal für jeweils 30 min bei RT geschüttelt. Das Polymer wird filtriert, gründlich mit DMF, THF und DCM gewaschen, im Vakuum getrocknet und gegebenenfalls mit dem KAISER-Test überprüft. Zur weiteren Kontrolle wird das Produkt

oxidativ mit DMDO vom Harz abgespalten und mittels NMR und LC-MS charakterisiert. Allgemeiner Prozedur für die Synthese von Peptidyl- α -Ketoaldehyden (57)

Abspaltung der TMSE-Schutzgruppe mittels TAS-F (65) zum Peptidyl-3-amino-2-oxo-1-phosphoranyliden propan (56)

Der 2'-trimethylsilyl-*N*-peptidyl-4-amino-3-oxo-2-phosphoranyliden-butylsäureester **54** (0.5 mg, 0.8 mmol) wird in wasserfreiem DMF (6 ml) suspendiert. Der Lösung wird TAS-F (661.1 mg, 2.4 mmol, 3 eq.) zugesetzt und 3 h bei RT gerührt. Das entstehende peptidyl-3-amino-2-oxo-1-phosphoranyliden propanes wird als Ausgangstufe für die Synthese von peptidyl- α,β -ungesättigten Verbindungen, für Peptidyl- α -ketoaldehyde und Peptidylketone. **IR (ATR):** $\nu = 3059, 3025, 2926, 2851, 2149, 1731, 1599, 1492, 1451, 1437, 1256, 1185, 1111, 751, 698, 569, 517, 512.$

Herstellung der DMDO-Lösung

In einem 250 ml-Dreihalskolben wird Natriumhydrogencarbonat (12 g) in Wasser (12 ml) und Aceton (13 ml, 177 mmol) suspendiert und effektiv gerührt. Der Kolben wird über ein gebogenes Glasrohr als Brücke mit einem Kühlmantel verbunden, welcher mit einer Aceton/Trockeneis-Mischung auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt wird. Als Auffangkolben dient ein 50 ml-Stickstoff-Kolben, welcher ebenfalls auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ wird. Nach Zugabe von Oxon (25 g, 41 mmol) in einer Portion wird der Dreihalskolben verschlossen und am Stickstoff-Kolben ein schwaches Vakuum (240 mbar) angelegt. Es wird für ca. 30 min destilliert. Man erhält ca. 12 ml einer hellgelben Lösung, die bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und möglichst umgehend verwendet wird.

Gehaltsbestimmung von DMDO-Lösung durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie

Es wird durch genaues Einwiegen von Thioanisol in einen 10 ml-Maßkolben und exaktes Auffüllen bis zur Eichmarke mit Aceton- d_6 eine Thioanisol-Maßlösung im Konzentrationsbereich von 0.5-0.6 mmol/ml angesetzt. Eine Probe der zu untersuchenden DMDO-Lösung (1 ml) wird mit der Maßlösung (0.4 ml) in einem Eppendorf-Cup versetzt, 5 min stehen gelassen und ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen. Aus dem Verhältnis der Integrale der Protonensignale im Phenylbereich (Thioanisol $\delta = 7.1-7.3$, entsprechendes

Sulfoxid $\delta = 7.6-7.9$) und unter der Annahme, dass DMDO komplett abreagiert hat, lässt sich die Konzentration der DMDO-Lösung errechnen. Die mit obiger Vorschrift hergestellten, verwendeten DMDO-Lösungen hatten eine mittlere Konzentration von 0.072 mmol/ml.

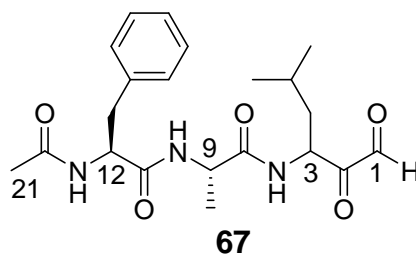
Allgemeine Prozedur für die oxidative Abspaltung von Peptidyl-3-amino-2-oxo-1-phosphoranylid propan (**56**) mit DMDO zum Peptidyl- α -Ketoaldehyd (**57**)

Das Peptidyl-3-amino-2-oxo-1-phosphoranylid propan **56** (0.5 mg, 0.8 mmol) wird in einem 50 ml-Kolben mit wasserfreiem DCM vorgequollen. Anschließend wird mit DMDO-Lösung (12 ml, ca. 0.072 mmol/ml, 0.864 mmol, 3.2-4.1 eq.) versetzt und bei 0 °C für 30 min gerührt, wobei die Orangefärbung des Harzes allmählich verblasst. Das Harz mit dem Abspaltungsprodukt wird über eine Kunststoff-Fritte abfiltrieren und noch mit 4 ml DCM gewaschen. Das überschüssige DMDO wird zusammen mit Aceton und DCM vorsichtig unter möglichst geringer Erwärmung des Kolbens (30-40 °C) im Vakuum entfernt. Das Produkt wird durch die präparative HPLC gereinigt und anschließend mit LC-MS und NMR charakterisiert.

Exemplarisch für die oxidative Abspaltung:

Ac-Phe-Ala-Leu-Ketoaldehyd (**67**)

N-Acetyl-L-phenylalanyl-L-alanyl-(S,S)-2-amino-3-isobutylpropanal (**67**)



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 0.79$ (d, 3H, C ^{δ 1}H₃ Leu C6), 0.83 (d, 3H, C ^{δ 2}H₃ Leu C7), 1.12 (d, 3H, C ^{β} H₃ Ala C10), 1.35 (m, 1H, C ^{β 1}H₂ Leu C4), 1.38 (m, 1H, C ^{β 2}H₂ Leu C4), 1.52 (m, 1H, C ^{γ} H Leu C5), 1.80 (s, 3H, CH₃-C=O), 2.8 (dd, 1H, C ^{β 1}H Phe C13), 2.8 (dd, 1H, C ^{β 2}H Phe C13) 4.25 (m, 1H, C ^{α} H Leu C3), 4.47 (m, 1H, C ^{α} H Ala C9), 4.89 (m,

^1H , C^αH Phe C12), 5.1 (s, 1H, CHO as hydrated form) 7.11-7.29 (m, 5H, arom.), 8.15 (d, 1H NH_I), 8.19 (d, 1H, NH_II), 8.25 (d, 1H, NH_III), 9.2 (s, 1H, CHO).

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 18.1, 22.47, 22.1, 24.5, 37.3, 41.3, 47.3, 52.2, 53.2, 126.5, 127.6, 128.3, 138.3, 170.0, 170.4, 170.8, 189.8.

HRMS: gerechnet $[(\text{M}+\text{H}^+)=\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_5]$ 404.2107; gefunden 404.2107 m/z. Reinheit vom Rohprodukt 95%. Ausbeute 68%.

6.3.2 Allgemeine Prozedur für die Synthese von Peptidyl-1,3-diamino-2-hydroxy-propanderivaten (71)

Beladung von TCP-Harz (68) mit Fmoc-Aminosäuren

Trockenes Tritylchlorid-PS-Harz (TCP-Harz, 1 g, 1.0 mmol/g, 1.0 mmol, Pepchem) wird in eine Filtersäule mit Kunststoff-Fritte eingewogen. Die Fmoc-Aminosäure (für Fmoc-Alanin: 329.8 mg, 1.0 mmol, 1 eq.) wird in DCM (10 ml) unter Zusatz von DIEA (513 μl , 4.5 mmol, 3 eq.) gelöst und die Lösung direkt zum TCP-Harz gegeben. Der Suspension wird soviel DCM zugesetzt, dass sie sich beim Schütteln gut durchmischt. Nach 1 h bei RT wird zum Capping der verbliebenen Tritylchlorid-Funktionen trockenes MeOH (3 ml) zugegeben und für weitere 15 min geschüttelt. Nach Filtration wird mit MeOH, DMF, THF und DCM gewaschen. Zur Beladungskontrolle wird eine quantitative Fmoc-Bestimmung durchgeführt. Mit Fmoc-Ala wurde eine Beladung von ca. 0.6 mmol/g erzielt.

Peptidsynthese am mit Fmoc-Aminosäure vorbelegten TCP-Harz zum Produkt (69)

Der Amino-Terminus des vorbelegten TCP-Harzes [für Fmoc-Ala-TCP-Harz (s.o.): 1.1 mmol] wird durch Behandlung mit 20 % Piperidin/DMF für (2 x) 6 min entschützt. Das Harz wird gründlich mit MeOH, DMF, THF und DCM gewaschen und in wasserfreiem DMF geschüttelt. Die jeweilige Fmoc-Aminosäure (für Ala-TCP-Harz Fmoc-Leucin: 1.943 g, 5.5 mmol, 5 eq.) wird mit HOBt- H_2O (für TCP-Leu-Harz: 842.2 mg, 5.5 mmol, 5 eq.) in ein PP-Röhrchen/Falcon eingewogen, in wasserfreiem DMF gelöst und mit DIC (für Leu-TCP-Harz: 851.6 μl , 5.5 mmol, 5 eq.) versetzt. Nach 5 min Voraktivierung wird die klare Lösung zum Polymer gegeben und für 3 h bei RT geschüttelt. Nach Filtration,

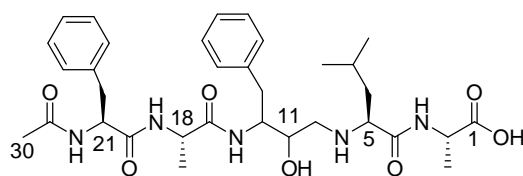
gründlichem Waschen mit MeOH, DMF, THF und DCM wird das Harz getrocknet oder erneut der Amino-Terminus entschützt und die Prozedur mit der nächsten Aminosäure wiederholt.

Reduktive Aminierung zur Synthese von Peptidyl-1,3-diamino-2-hydroxy-propanderivaten (71)

Zunächst wird die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten nach der oben beschriebenen Prozedur. Anschließend wird das entschützte TCP-Ala-Leu (94.7 mg, 0.6 mmol/g, 0.06 mmol) mit DMF/1% AcOH vorgequollen. Währenddessen wird das Peptidyl- α,β -ketoaldehyd (30 mg, 0.07 mmol) in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf) eingewogen und mit DMF/1% AcOH gelöst. Man löst NaCNBH₃ (3 eq, 13.9 mg) auch mit dem gleichen Lösungsmittel (1 ml). Das NaCNBH₃ und das Peptidyl- α -Ketoaldehyd werden zum Harz gegeben. Es wird 5 h bei RT geschüttelt, anschließend gibt man NaBH₄ (5 eq, 13.99 mg) gelöst in EtOH (0.7 ml) und lässt weitere 3 h schütteln. Es wird gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Abspaltung von Peptidyl-1,3-diamino-2-hydroxy-propanderivat (71) vom Eduktharz (70)

Das Produkt wird vom Harz abgespalten, indem man 20% Trifluoroethanol/DCM (3 ml) dazu gibt. Nach 20 min wird das Produkt in ein Glasröhrchen abfiltriert und das Abspaltungsreagenz wird noch zweimal zum Harz dazugegeben. Jedes einzelne Mal wird 20 min geschüttelt und abfiltriert. Die Lösung wird im Rotationsverdampfer evaporiert. Daraufhin wird das Produkt lyophilisiert und mit LC/MS und NMR charakterisiert.

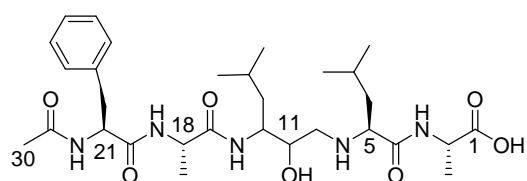


71a

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 0.8-0.9 (m, 6H, C ^{δ 1 δ 2} H₃Leu C8,C9), 1.05-1.55 (m, 9H, C ^{β} H₂ Leu C6, C ^{γ} H Leu C7, CH₃ Ala C3, CH₃ Ala C22), 1.47-1.54 (m C ^{β} H₂ Leu, C ^{γ} H Leu C7), 1.73 (s, 3H, CH₃CO C30), 2.53-2.98 (m, 6H, C ^{β} H₂ Phe C13, C ^{β} H₂ Phe C25,

CH_2CHOH C10), 3.5 (bs, 1H, CHOH C11), 3.65 (bs, 1H, C^αH Leu C12). 3.97 (bs, 1H, C^αH Phe C24), 4.1 (m, 1H, C^αH Ala C21), 4.26 (m, 1H C^αH Ala C2), 4.45 (m, 1H C^αH Phe C1), 7.2 (m 10H, *Phe* C14-C18, *Phe* C26-31), 7.6 (d, 1H, NH_{II} Phe), 8.1 (d, 1H, NH_{III} Ala).

HRMS: Theorie $[(\text{M}+\text{H}^+)=\text{C}_{33}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{O}_7]$ 626.3593; gemessen 626.3557 m/z. Reinheit vom Rohprodukt 90%. Ausbeute 43%



71b

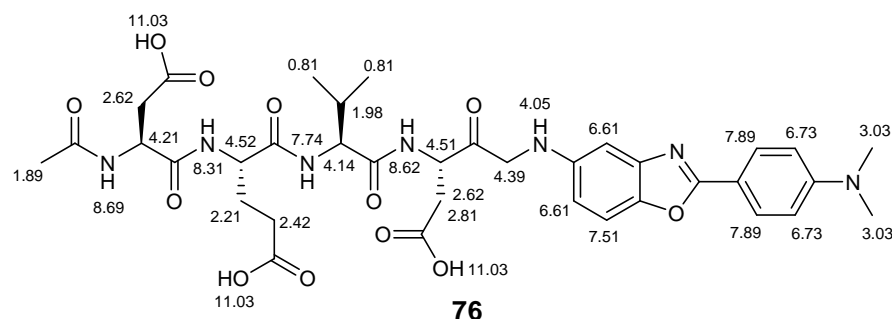
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 0.73\text{-}0.95$ (m, 12H, $\text{C}^{\delta 1\delta 2}\text{H}_3$ Leu C8,C9, $\text{C}^{\delta 1\delta 2}\text{H}_3$ Leu C15,C16), 1.15-1.25 (m, 3H, C^βH_3 Ala C19), 1.27-1.36 (m, 3H, C^βH_3 Ala C3), 1.35-1.53 (m, 4H, $\text{C}^{\beta 1,\beta 2}\text{H}_2$ Leu C6, $\text{C}^{\beta 1,\beta 2}\text{H}_2$ Leu13), 1.59-1.65 (m, 2H, C^γH Leu C7 C^γH Leu C14), 1,74 (s, 3H, CH_3CO C30), 2.5-3.0 (m, 4H, $\text{C}^{\beta 1,\beta 2}\text{H}_2$ Phe, C22, and CH_2CHOH C10), 3.5 (bs, 1H, CHOH C11), 3.65 (bs, 1H, C^αH Leu C12), 3.75-3.9 (bs 1H, C^αH Leu C5), 4.1-4.3 (m, 2H, C^αH Ala C2, C^αH Ala C18), 4.5 (m, 1H C^αH Phe C21), 5.5 (d, 1H, OH), 7.1-7.3 (m, 5H phe), 7.2 (d, 1H, NH_{I} Ala), 7.6, (d, 1H, NH_{II} Ala), 7.75 (d, 1H, NH_{III} Leu), 8.1 (d, 1H, NH_{IV} Phe).

HRMS: Theorie $[(\text{M}+\text{H}^+)=\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_7]$ 591.3632; gemessen 591.3693 m/z. (Reinheit vom Rohprodukt (93%); (Ausbeute 40%).

Reduktive Aminierung mittels Trichlorosilan zum Produkt

Das Peptidyl- α,β -Ketoaldehyd **73** (10 mg, 0.018 mmol) wird unter Stickstoff in DMF/1% AcOH (1 ml) gelöst. Dazu gibt man das nucleophile Fragment **74** (4.5 mg, 0.018 eq.). Nach drei Stunden gibt man Trichlorosilane (10 eq.). Auf Grund der Flüchtigkeit des Trichlorosilans wird Das Reaktionsgefäß verschlossen. Die Reaktion läuft weitere 3 Stunden bei RT.es wird evaporiert und anschließend chromatographisch gereinigt. Das Produkt wurde mit LC/MS und NMR charakterisiert.

3- (N-acetyl-[(L)-aspartyl]-[(L)-glutamyl]-[(L)-valinyl])- (L)-amino-5-{2-(4-dimethylamino-phenyl)-benzoxazol-5-ylamino}-4-oxo-pentanoic acid (76)



¹H-NMR (600 MHz DMSO-*d*₆): δ = 0.81 (m, 6H; CH(CH₃)₂), 1.89 (s, 3H; CHCH₃), 1.98 (m, 1H; CH(CH₃)₂), 2.21 (m, 2H; CH₂CH₂COOH), 2.42 (m, 2H; CH₂CH₂COOH), 2.62, 2.81 (m, 2H; CH₂COOH), 3.03 (m, 6H; NCH₃), 4.05 (br, 1H; COCH₂NH), 4.14 (m, 1H; CH), 4.21 (m, 1H; CH), 4.39 (s, 2H; COCH₂NH), 4.51 (m, 1H; CH), 4.52 (m, 1H; CH), 6.61 (s, 2H; CH), 6.73 (m, 2H; CH), 7.51 (d, *J* = 2 Hz, 1H; CH), 7.74 (m, 1H; NHCHCH(CH₃)₂), 7.89 (m, 2H, CH), 8.31 (m, 1H; NHCHCH₂CH₂COOH), 8.62 (m, 1H; NHCHCH₂COOH), 8.69 (m, 1H; NHCHCH₂COOH), 11.03 (br, 3H, COOH) ppm.

HRMS: Theorie [(M+H⁺) = C₃₆H₄₅N₇O₁₂] 768.31262; gemessen 768.31371 m/z. (Reinheit vom Rohprodukt (93%); (Ausbeute 39%).

6.3.3 Allgemeiner Synthesekonzept zur Herstellung von Chinoxalinsynthese ausgehend vom Peptidyl- α -Ketoaldehyd (66), und Peptidyl-2,3-Diketoester (55a)

Das Peptidyl- α -Ketoaldehyd (10 mg, 0.023 mmol) wird in trockenem DCM gelöst. Das in DCM gelöste *O*-Phenyldiamin wird dazu gegeben. Die Reaktion läuft über Nacht bei RT. Das Produkt wird über die präparative HPLC gereinigt, anschließend wird gefriergetrocknet. Das Produkt wurde mit LC-MS und NMR analysiert. Die gleiche Prozedur gelte für Chinoxalinsynthese ausgehend vom Peptidyl-2,3-Diketoester **55a** mit dem Unterschied, dass man auf 80 °C erhitzen muß.

N-Acetyl-L-phenylalanyl-L-alanyl(S,S)-(1S)-benzyl-1-(chinoxalin-2-yl)methylamin

(72)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ=1.17 (d, 3H, C^βH₃ J = 7.50 Ala), 1.72 (s, 3H, CH₃CO), 2.95-3.0 (m, 2H, C^{β1,β2}H₂ Benzyl), 3.35-3.55 (m, 1H, C^{β1,β2}H₂ Phe), 4.27-4.30 (m, 1H, C^αH, Ala), 4.46-4.50 (m, 1H, C^αH Phe), 5.35-5.39 (m, 1H, C^αH Benzyl), 7.1-7.28 (m, 10H, Benzyl, Phe), 7.82-7.83 (d, 1H, J = 8.55, NH_I), (8.01-8.14 (m, 4H, 1,2-Phenylenediamine), 8.50-8.52 (d, 1H, J = 7.33, NH_{II}), 8.84 (s, 1H, CH-N, 1,2-Phenylenediamine); HRMS: Theorie [(M+H⁺)= [C₃₀H₃₂N₅O₃]510.2460; gemessen 510.2458 m/z. (Ausbeute 75%); (Reinheit vom Rohprodukt 53).

N-Acetyl-L-phenylalanyl-L-alanyl(S,S)-(1S)-isobutyl-1-(2-carbomethoxyquinoxaline-3-yl)methylamine (81)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ=0.92-0.96 (t, 6H, C^{δ1}H₃, C^{δ2}H₃, J = 6.10, isobutyl), 1.13-1.15 (d, 3H, C^βH₃, J = 7.33, Ala), 1.19-1.29 (m, 3H, C^{β1,β2}H₂ isobutyl, C^γH isobutyl), 1.71 (s, 3H, CH₃CO), 2.62-2.70 and 2.96-2.99 (bs, 2H, C^{β1,β2}H₂, Phe), 3.99 (s, 3H, CH₃COOMe), 4.26-4.33 (m, 1H, C^αH, Ala), 4.45-5.0 (m, 1H, C^αH, Phe), 5.56-5.63 (t, 1H, C^αH isobutyl), 7.1-7.23 (m, 5H, Phe), 7.90-8.78 (m, 4H, arom., 1,2-phenylenediamine), 8.14-8.18 (d, 1H, J = 8.55, NH_I), 8.34-8.36 (d, 1H, J = 7.33, NH_{II}).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ=17.9, 21.4, 22.4, 23.2, 24.6, 37.5, 43.0, 47.9, 49.2, 53.1, 53.7, 126.1, 127.9, 129.1, 132.3, 138.0, 139.3, 143.7, 155.7, 165.4, 169.1, 171.9; HRMS: calcd [(M+H⁺)]=[C₂₉H₃₆N₅O₅] 534.2681; found 534.2675 m/z. (Ausbeute 64 %), Reinheit vom Rohprodukt 85 %).

6.4 Allgemeine Prozedur für die Synthese von Peptidyl-1-amino-3-buten-4-one (Peptidyl-Vinylketone) (58a-h)

- Bei aromatischen Carbonylverbindungen war es nötig auf 60°C zu erwärmen

Das Peptidyl-3-amino-2-oxo-1-phosphoranyliden propan **56** (0.5 mg, 0.8 mmol) wird in einem kleinen Kolben (10 ml) mit wasserfreiem THF vorgequollen. Der frisch destillierte Aldehyd wird dazu gegeben. Die Reaktion wird 12 h bei RT gerührt. Das Abspaltungsprodukt wird über eine Kunststoff-Fritte abfiltrieren und das Lösungsmittel

wird unter gemindertem Druck am Rotationsverdampfer eingeengt. Anschließend wird das Produkt lyophilisiert und mit LC-MS und NMR charakterisiert.

Darstellung der NMR-Daten von einigen im Rahmen der Dissertation synthetisierten Peptidyl-Vinylketonen.

N-Acetyl-L-phenylalanyl-(S,E)-1-amino-1-benzyl-6-methyl-hept-3-en-2-on (58a)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=0.89 (d, 3H, J = 9.8, CH₃ isobutyl), 0.95, (d, 3H, J = 8.5, CH₃ Isobutyl), 1.65-1.81 (m, 1H, CH isobutyl), 1.94 (s, 3H, CH₃CO), 2.07 (bt, 2H, J = 6.1, CH₂ Isobutyl), 2.9-3.2 (m, 4H, C^{β1,β1',β2,β2'}H Phe, Benzyl), 4.64-4.78 (m, 1H, C^αH Phe), 4.85-5.05 (m, 1H, C^αH Benzyl), 6.05 (d, 1H, J = 15.9, CH Olefine), 6.15 (d, 1H, J = 7.3, NH_I), 6.56 (d, 1H, J = 7.3, NH_{II}), 6.86-7.06 (m, 10 H arom. Phe1, Phe 2, CH Olefine).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ =21.9, 22.7, 27.3, 37.6, 37.8, 41.4, 53.9, 56.6, 126.5, 126.5, 127.6, 127.9, 128.1, 128.7, 128.9, 135.3, 135.9, 148.9, 169.3, 169.9, 195.6.

HRMS: Theorie [(M+H⁺)]=[C₂₆H₃₃N₂O₃] 421.2481; gemessen 421.2456 m/z. (Ausbeute 68 %); (Reinheit vom Rohprodukt 80 %).

N-Acetyl-L-phenylalanyl-(S,E)-1-amino-1-benzyl-4-(2-chloro-6-fluorophenyl)-but-3-en-2 on (58b)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=1.95 (s, 3H, CH₃CO), 2.98-3.19 (m, 4H, C^{β1,β2}H₂ Benzyl, C^{β1,β2}H₂ Phe), 4.65-4.74 (m, 1H, C^αH Phe), 4.99-5.06 (m, 1H, C^αH Benzyl), 6.14-6.17 (d, 1H J = 8.55), 6.56-6.59 (d, 1H J = 7.33), 6.95-7.33 (m, 13H, 2-chloro-6-fluorophenyl, Benzyl, Phe, C^αH, C^βH Vinyl), 7.80-7.81 (d, 1H, J = 4.88, NH_I), 7.85-7.86 (d, 1H, J = 4.88, NH_{II}).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ =22.7, 37.1, 37.9, 53.9, 57.9, 114.3, 114.7, 120.9, 121.1, 125.7, 126.7, 128.0, 128.1, 128.2, 128.3, 128.5, 128.6, 128., 128.9, 130.9, 133.9, 135.0, 135.9, 135.9, 136.2, 136.3, 169.5, 170.0, 195.7.

HRMS: Theorie [(M+H⁺)]=[C₂₈H₂₇ClFN₂O₃]+Et₃N 595.2926, gemessen 595.2939 m/z. (Ausbeute 70 %), (Reinheit vom Rohprodukt 62 %).

N-Acetyl-L-phenylalanyl-(S,E)-1-amino-1-isopropyl-4-thiophen-3-en-2-on (58c)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=0.78 (d, 3H, C^{γ1}H₃, J = 8.95 isopropyl), 0.96 (d, 3H, C^{γ2}H₃, J = 8.94 isopropyl), 2.0 (s, 3H, CH₃CO), 2.90-2.95 (m, 1H, C^{β1,β2}H₂ isopropyl), 3.08-3.11 (m, 2H, C^{β1,β2}H₂ Phe), 4.64 (m, 1H, C^αH Phe), 4.74 (m, 1H, C^αH isopropyl), 7.08-7.55 (m, 7H, Phe, Thiophen., C^αH, C^βH Vinyl).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ=13.0, 23.3, 32.0, 34.2, 50.1, 56.4, 121.3, 126.5, 127.6, 128.1, 128.5, 128.7, 130.4, 132.4, 135.6, 143.5.

HRMS: Theorie [(M+H⁺)]=[C₂₂H₂₇N₂O₃S]+Et₃N 500.2959; gemessen 500.2967 m/z. (Ausbeute 65 %); (Reinheit vom Rohprodukt 85 %).

N-Acetyl-L-leuciny-(S,E)-1-amino-1-benzyl-4-(2-chloro-6-fluorophenyl)-but-3-en-2-on (58d)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=0.97 (d, 3H, J = 7.3, C^δH₃ Leu), 0.98, (d, 3H, J = 6.1, C^{δ2}H₃ Leu), 1.14-1.28 (m, 2H, C^{β1,β2}H₂ Leu), 1.32-1.50 (m, 1H, C^γH Leu), 1.76 (s, 3H, CH₃CO), 2.85 (dd, 1H, J = 15, 9.7, C^{β1}H Benzyl), 3.15 (dd, 1H, J = 15, 8.5, C^{β2}H Phe), 4.27 (m, 1H, C^αH Benzyl), 4.71 (m, 1H, C^αH Leu), 7.13 (d, 1H, J = 15.8, C^αH Vinyl), 7.15-7.50 (m, 5H, Benzyl, 2-chloro-6-fluorophenyl), 7.6 (d, J = 14.7, C^βH Vinyl), 7.68 (dd, J = 8.5, 4.9, 1H, 2-chloro-6-fluorophenyl), 7.95 (d, 1H, J = 8.6, NH_I), 8.54 (d, 1H, J = 8.6, NH_{II}).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ=21.8, 22.3, 22.6, 23.9, 37.9, 40.9, 50.8, 58.6, 115.9, 116.2, 121.1, 121.5, 126.2, 126, 127.9, 128, 129.2, 129.3, 136.1, 136.2, 137.5, 137.7, 160.6, 168.7, 168.8, 172.3, 172.5, 178.2.

HRMS: Theorie [(M+H⁺)]=[C₂₅H₂₉ClF₂N₂O₃]+Et₃N 561.3082; gemessen 561.3110 m/z. (Ausbeute 78 %); (Reinheit vom Rohprodukt 64 %).

N-Acetyl-L-phenylalanyl-(S,E)-1-amino-1-isopropyl-4-(2-chloro-6-fluorophenyl)-but-3-en-2-on (58e)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=0.82 (d, 3H, J = 7.3, C^{γ1}H₃ isopropyl), 0.89 (d, 3H, J = 7.3, C^{γ2}H₃ isopropyl), 1.74 (s, 3H, CH₃CO), 1.27 (m, 1H, C^βH isopropyl), 2.71 (dd, 1H, J = 14.6, 9.7, C^{β1}H Phe), 2.95 (dd, 1H, J = 13.4, 4.9, C^{β2}H Phe), 4.37 (t, 1H, J = 7.3, C^αH

isopropyl), 4.64 (ddd, 1H, J = 9.8, 9.8, 4.9, $C^\alpha H$ Phe), 7.07-7.24 (m, 5H Phe, 2-chloro-6-fluorophenyl), 7.32 (dd, J = 7.3, 2.4, 1H, 2-chloro-6-fluorophenyl), 7.40 (d, 1H, J = 16.1, $C^\alpha H$ Vinyl), 7.45-7.51 (m, 2H Phe), 7.65 (d, 1H, J = 15.9, $C^\beta H$ Vinyl), 8.14 (d, J = 8.5, 1H, NH_I), 8.39 (d, 1H, J = 7.3, NH_{II}).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ =18.1, 19.4, 22.4, 29.1, 37.5, 36.0, 53.4, 60.8, 115.4, 115.7, 120.9, 121.1, 126.1, 126.3, 126.4, 127.9, 129.1, 129.5, 129.7, 131.6, 131.7, 132.1, 132.3, 135.1, 135.2, 137.8, 159.6, 162.9, 169.0, 172.0, 197.2.

HRMS: Theorie $[(M^+)]=[C_{24}H_{27}ClFN_2O_3]+Et_3N$ 546.2893; gemessen 546.2912 m/z. (Ausbeute 74 %); (Reinheit vom Rohprodukt 61 %).

N-Acetyl-L-phenylalanyl-(S,E)-1-amino-1-isopropyl-(5,5,5-tribromo)-pent-3-en-2-on (58f)

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ =0.83 (d, 3H, J = 3.60, $C^{\gamma 1}H_3$ isopropyl), 0.86 (d, 3H, J = 3.44, $C^{\gamma 2}H_3$ isopropyl) 2.73 (s, 3H, CH_3CO), 2.52-2.56 (bs, 1H, $C^\beta H$ isopropyl), 2.72 (bs, 2H, $C^{\beta 1\beta 2}H_2$ Phe), 4.3 (m, 1H, $C^\alpha H$ Phe), 4.60-4.62 (m, 1H, $C^\alpha H$ isopropyl), 6.9-7.24 (m, 7H, Phe., $C^\alpha H$, $C^\beta H$ Vinyl), 8.12, 8.93 (bs, 2H, NH_I , NH_{II}).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ =17.6, 19.2, 22.4, 34.1, 36.2, 58.4, 93.8, 125.8, 126.5, 128.2, 136.3, 140.1, 167.2, 171, 178.4, 196.1.

HRMS: Theorie $[(M^+)]=[C_{23}H_{23}Br_3N_2O_3]$ 564.8958; gemessen 564.8812 m/z. (Ausbeute 72 %); (Reinheit vom Rohprodukt 80 %).

N-Acetyl-L-phenylalanyl-L-alanyl-(S,S,E)-1-amino-1-benzyl-pent-3-en-2-one (58h):

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ=1.14-1.16 (d, 3H, J = 7.33, C^βH₃ Ala), 1.71 (s, 3H, CH₃ Vinyl), 1.84 (s, 3H, CH₃CO), 2.66-2.77 (m, 2H, C^{β1,β2}H₂ Phe), 2.94-3.06 (m, 2H, C^{β1,β2}H₂ Benzyl), 4.21-4.26 (m, 1H, C^αH Benzyl), 4.44-4.47 (m, 1H, C^αH Phe), 4.66-4.68 (m, 1H, C^αH Ala), 6.30-6.35 (d, 1H, J = 15.87, C^αH Vinyl), 6.81-6.89 (m, 1H, C^βH Vinyl), 7.1-7.25 (m, 10H Benzyl, Phe), 8.14-8.16 (d, 1H, J = 8.55, NH_I, Phe), 8.28-8.24 (d, 1H, J = 7.33, NH_{II}, Ala), 8.34-8.37 (d, 1H, J = 7.32, NH_{III}, Phe-Ac);

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ=18.1, 22.4, 30.4, 34.3, 48.3, 57.4, 124.8, 126.0, 126.2, 128.0, 127.9, 129.0, 129.1, 137.5, 137.6, 137.1, 138.1, 138.0, 139.1, 143.8, 169.1, 171.1, 172.1, 196.7; HRMS: gerechnet [(M+H⁺)]=[C₂₆H₃₂N₃O₄] 450.2350; gefunden 450.2347 m/z. (Ausbeute 74%); Reinheit vom Rohprodukt 90 %).

N-Acetyl-L-phenylalanyl-L-alanyl-(S,S,E)-1-amino-1-benzyl-6-methyl-hept-3-en-2-on(58i)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ=0.82-0.85 (d, 6H, J = 4.88, CH₃CHCH₂), 1.13-1.15 (d, 3H, J = 7.32, C^βH₃, Ala), 1.71 (s, 3H, CH₃CO), 1.88 (m, 1H, C^δH Vinyl), 2.03-2.17 (m, 2H, C^βH₂ Vinyl), 2.65-3.55 (m, 4H, C^{β1,β2}H₂ Benzyl, C^{β1,β2}H₂ Phe), 4.21-4.26 (t, 1H, J = 14.65, 7.32 C^αH benzyl), 4.44-4.5 (m, 1H, C^αH Phe), 4.67-4.7 (m, 1H, C^αH Ala), 6.26-6.31 (d, 1H, J = 15.87 C^αH Vinyl), 6.7-6.86 (m, 1H, C^βH Vinyl), 7.1-7.28 (m, 10H benzyl, Phe), 8.22-8.25 (d, 1H, NH_I, J = 8.55 Phe), 8.47-8.52 (d, 1H, NH_{II}, J = 7.33 Ala), 8.63-8.66 (d, 1H, NH_{III}, J = 7.32 Phe-Ac).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ =22.1, 22.4, 22.8, 25.6, 27.2, 30.4, 34.4, 46.4, 53.9, 124.9, 126.0, 126.2, 127.9, 128.0, 128.1, 129.1, 137.6, 138.2, 139.2, 169.1, 171.1, 172.2, 196.9.

HRMS: Theorie [(M+H⁺)]=[C₂₉H₃₈N₃O₄] 492.2818; gemessen 492.2830 m/z. (Ausbeute 80%); (Reinheit vom Rohprodukt 71%).

6.4.1 Synthese von Peptidylheterozyklen ausgehend vom Peptidyl-1-amino-3-buten-4-on (Peptidyl-Vinylketone) (**58h**, **58i**)

6.4.1.1 Allgemeine Vorschrift für die Synthese von Peptidylpyrazolinen (**82a-d**)

Peptidyl-1-amino-3-buten-4-on (10 mg, 0.022 mmol, 1 eq.) wird in wasserfreiem THF in einem Stickstoffkolben gelöst. Dazu gibt man unter Stickstoff Hydrazin in THF (0.066 mmol, 3 eq). Die Reaktion wird bei 80 °C für 8 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vacuum eingeeengt und das Produkt wird mittels präparativer HPLC gereinigt. Das Produkt wird gefriergetrocknet und mit LC/MS und NMR charakterisiert.

N-Acetyl-L-phenylalanyl-L-alanyl-(S,S)-(1S)-benzyl-1-(5-methyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-3-yl)methylamin (82a)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ=1.14-1.16 (d, 3H, J = 6.11, CH₃-pyrazoline), 1.19-1.22 (d, 3H, J = 9.77, C^βH₃, Ala), 1.73 (s, 3H, CH₃CO), 2.53-2.54 (d, 2H, J = 4.89, CH₂-pyrazoline), 2.63-2.71 and 2.93-3.11 (m, 4H, C^{β1,β2}H₂ Benzyl, C^{β1,β2}H₂ Phe), 4.16-4.20 (m, 1H, CH pyrazoline), 4.45-4.50 (m, 1H, C^αH Ala), 4.65-4.75 (m, 1H, C^αH Benzyl), 5.0-5.10 (m, 1H, C^αH Phe), 5.86 (s, 1H, NH pyrazoline), 7.16-7.27 (m, 10H, arom. Benzyl, Phe), 8.05-8.16 (d, 1H, J = 7.33, NH_I, Phe), 8.19-8.21 (d, 1H, J = 8.55, NH_{II}, Ala).

HRMS: Theorie [(M+H⁺)]=[C₂₆H₃₄N₅O₃] 464.2508; gemessen 464.2501 m/z. (Ausbeute 65 %); (Reinheit vom Rohprodukt 95 %).

N-Acetyl-L-phenylalanyl-L-alanyl-(S,S)-(1S)-benzyl-1-(1,5-dimethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-3-yl)methylamin (82b)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ=1.14-1.22 (m, 6H, CH₃-pyrazoline, C^βH₃, Ala), 1.73 (s, 3H, CH₃CO), 2.09-2.16 (m, 2H, CH₂-pyrazoline), 2.55-3.0 (m, 8H, CH-pyrazoline, CH₃-N-pyrazoline, C^{β1,β2}H₂ Benzyl, C^{β1,β2}H₂ Phe), 4.16-4.20 (m, 1H, C^αH, Ala), 4.45-4.50

(m, 1H, $C^\alpha H$ Benzyl), 7.15-7.23 (m, 10H, Benzyl, Phe), 8.05-8.16 (d, 1H, $J = 8.55$ NH_I , Phe), 8.19-8.21 (d, 1H, $J = 7.33$, NH_{II} , Ala).

HRMS: Theorie $[(M+H^+)]=[C_{27}H_{36}N_5O_3]$ 478.2673; gemessen 478.2693 m/z. (Ausbeute 61 %); (Reinheit vom Rohprodukt 98 %).

N-Acetyl-L-phenylalanyl-L-alanyl-(S,S)-(1S)-benzyl-1-(5-isobutyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-3-yl)methylamin (82c)

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta=0.79$ - 0.85 (m, 6H, $(CH_3)_2$, isobutyl), 1.12-1.34 (bs, 5H, CH_2 -CH-isobutyl, $C^\beta H_3$, Ala), 1.51-1.58 (m, 1H, CH-isobutyl), 1.73 (s, 3H, CH_3CO), 1.76-1.78 (m, 2H, CH_2 -pyrazoline), 2.68-2.72, 2.84-3.01 (m, 4H, $C^{\beta 1, \beta 2} H_2$ benzyl, $C^{\beta 1, \beta 2} H_2$ Phe), 3.49-3.53 (m, 1H, CH-pyrazoline), 4.16-4.21 (m, 1H, $C^\alpha H$, Ala), 4.43-4.50 (m, 1H, $C^\alpha H$, Benzyl), 4.65-4.70 (m, 1H, $C^\alpha H$, Phe), 6.39 (s, 1H, NH -pyrazoline), (m, 10H, benzyl, Phe), 8.08-8.11 (d, 1H, $J = 8.55$, NH_I , Phe), 8.19-8.22 (d, 1H, $J = 8.45$, NH_{II} , Ala), 8.30-8.33 (d, 1H, $J = 8.54$, NH_{III} , Phe).

HRMS: gerechnet $[(M+H^+)]=[C_{29}H_{40}N_5O_3]$ 506.3086; gemessen 506.3099 m/z. (Ausbeute 67 %); (Reinheit vom Rohprodukt 89 %).

N-Acetyl-L-phenylalanyl-L-alanyl-(S,S)-(1S)-benzyl-1-(1-methyl-5-isobutyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-3-yl)methylamin (82d)

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta=0.81$ - 0.82 (d, 3H, $J = 2.44$, CH_3 , isobutyl), 0.85-0.86 (d, 3H, $J = 4.88$, CH_3 , isobutyl), 1.11-1.14 (d, 3H, $J = 7.33$, $C^\beta H_3$, Ala), 1.22-1.28 (m, 2H, CH_2 isobutyl), 1.59-1.66 (m, 1H, CH isobutyl), 1.72 (s, 3H, CH_3CO), 1.93-1.94 (d, 2H, $J = 2.44$, CH_2 , pyrazolin), 2.19-3.24 (m, 8H, CH_3 pyrazolin, $C^{\beta 1, \beta 2} H_2$, $C^{\beta 1, \beta 2} H_2$ Phe, CH pyrazolin), 4.14-4.18 (m, 1H, $C^\alpha H$, Ala), 4.43-4.50 (m, 1H, $C^\alpha H$, Phe), 4.63-4.67 (m, 1H, $C^\alpha H$, Benzyl), 6.85 (bs, 1H, NH_I , Benzyl), 7.15-7.22 (m, 10 H, Benzyl, Phe), 8.14-8.17 (d, 1H, $J = 8.55$, NH_{II}), 8.31-8.33 (d, 1H, $J = 7.33$, NH_{III}).

HRMS: gerechnet $[(M+H^+)]=[C_{30}H_{42}N_5O_3]$ 520.3148; gemessen 520.3133 m/z. (Ausbeute 66 %); (Reinheit vom Rohprodukt 95 %).

6.4.1.2 Oxidation von Peptidylpyrazolinen zu Peptidylpyrazolen (83)

2,3-dichloro-5,6-dicyano-*p*-benzoquinon (DDQ) (1,2 eq., 0.012 mmol) gelöst in Toluol wird unter Rühren zum ebenfalls in Toluol gelöstem Peptidylpyrazolin (1 eq., 0.01 mmol) gegeben. Die Reaktion wird 12h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird anschließend über Celite filtriert und mit Ether gewaschen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer eingeengt. Das Produkt wird präparativ gereinigt und anhand LC-MS und NMR charakterisiert.

N-Acetyl-L-phenylalanyl-L-alanyl-(S,S)-(1S)-benzyl-1-(5-methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)methylamin (83a)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ=1.22 (bs, 3H, C^βH₃ Ala), 1.73 (s, 3H, CH₃CO), 1.98 (s, 3H, CH₃-pyrazole), 2.65-2.73 (m, 2H, C^{β1,β2}H₂, Phe), 2.91-2.95 (m, 2H, C^{β1,β2}H₂ Benzyl), 4.20-4.24 (m, 1H, C^αH, Ala), 4.46-5.49 (m, 1H, C^αH Benzyl), 4.99-5.05 (m, 1H, C^αH, Phe), 5.31 (s, 1H, CH-pyrazole), 5.86 (s, 1H, NH pyrazole), 6.64 (d, 1H, NH_I, J = 8.45 Phe), 7.12-7.25 (m, 10H Benzyl, Phe), 8.02 (d, 1H, NH_{II}, J = 8.45 Phe), 8.19-8.21 (d, 1H, NH_{III}, J = 8.45 Ala).

HRMS: Theorie [(M+H⁺)]=[C₂₆H₃₂N₅O₃] 462.2508; gemessen 462.2505 m/z. (Ausbeute 90 %); (Reinheit vom isolierten Produkt 95 %).

N-Acetyl-L-phenylalanyl-L-alanyl-(S,S)-(1S)-benzyl-1-(1,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-3-yl)methylamin (83b)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ=1.12-1.13 (d, 3H, C^βH₃, J = 7.33 Ala), 1.72 (s, 3H, CH₃CO), 2.16 (s, 3H, CH₃-pyrazole), 2.64-2.68 (m, 2H, C^{β1,β2}H₂, Phe), 2.92-2.94 (m, 2H, C^{β1,β2}H₂ Benzyl), 3.60 (s, 3H, CH₃-N-pyrazole), 4.20-4.26 (m, 1H, C^αH, Ala), 4.47-4.49 (m, 1H, C^αH Phe), 4.92-4.98 (m, 1H, C^αH Benzyl), 5.87 (s, 1H, CH-pyrazole), 7.12-7.22 (m, 10H, Benzyl, Phe), 7.96-7.97 (d, 1H, NH_I, J = 8.45 Phe), 8.04-8.08 (d, 1H, NH_{II}, J = 7.66 Ala); 8.10-8.12 (d, 1H, NH_{III}, J = 7.31 Ala).

HRMS: Theorie [(M+H⁺)]=[C₂₇H₃₄N₅O₃] 476.2700; gemessen 476.2692 m/z. (Ausbeute >90 %); (Reinheit vom isolierten Produkt 95 %).

N-Acetyl-L-phenylalanyl-L-alanyl-(S,S)-(1S)-benzyl-1-(1-methyl-5-isobutyl-1H-pyrazol-3-yl)methylamin (83c)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ=0.85-0.87 (m, 6H, (CH₃)₂, isobutyl), 1.12-1.14 (d, 3H C^βH₃, J = 7.35 Ala), 1.72 (s, 3H, CH₃CO), 1.80-1.95, (bs, 1H, CH(CH₃)₂), 2.39-2.41 (d, 2H, J = 6.10 CH₂CH(CH₃)₂), 2.61-2.71 (m, 2H, C^{β1,β2}H₂ Phe), 2.89-2.97 (m, 2H, C^{β1,β2}H₂, Phe), 3.60 (s, 3H, CH₃-N pyrazole), 4.17-4.28 (m, 1H, C^αH Ala), 4.42-4.50 (m, 1H, C^αH Phe), 4.92-5.02 (m, 1H, C^αH Benzyl), 5.84 (s, 1H, CH-pyrazole), 7.09-7.23 (m, 10H, Benzyl, Phe), 7.93 (d, 1H, NH_I, J = 8.55 Phe), 7.96 (d, 1H, NH_{II}, Ala), 8.03-8.06 (d, 1H, NH_{III}, J = 8.54 Phe) HRMS: Theorie [(M+Na⁺)]=[C₂₆H₃₂N₅O₃] 540.2955; gemessen 540.2950 m/z. (Ausbeute >90 %); (Reinheit vom isoliertem Produkt 95 %).

N-Acetyl-L-phenylalanyl-L-alanyl-(S,S)-1(S)-benzyl-1-(1-phenyl-5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)methylamin (83d)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ=1.16-1.18 (d, 3H, C^βH₃ J = 7.32 Ala), 1.74 (s, 3H, CH₃CO), 2.28 (s, 3H, CH₃-pyrazole), 2.62-2.71 (m, 2H, C^{β1,β2}H₂ Benzyl), 2.91-3.04, 3.12-3.21 (m, 2H, C^{β1,β2}H₂ Phe), 4.21-4.28 (m, 1H, C^αH Ala), 4.43-4.52 (m, 1H, C^αH Phe), 5.05-5.13 (m, 1H, C^αH Benzyl), 6.16 (s, 1H, CH-pyrazole), 7.14-7.25 and 7.36-7.50 (m, 15H, aromatic), 8.04 (d, 1H, NH_I, J = 8.55 Phe), 8.12 (d, 1H, NH_{II}, J = 8.54 Phe). HRMS: Theorie [(M+H⁺)]=[C₂₆H₃₂N₅O₃] 538.2821; gerechnet 538.2810 m/z. (Ausbeute >90%); (Reinheit vom isoliertem Produkt 95%).

6.4.1.3 Isoxazolinsynthese (84)

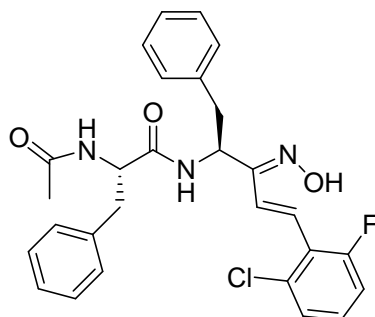
Zum in EtOH gelösten Peptidyl-1-amino-3-buten-4-on (20 mg, 0.05 mmol) gibt man unter Rühren in EtOH gelöstes Hydroxylamin hydrochlorid (0.14 mmol, 3 eq.) und katalytische Mengen von Essigsäure und Natriumacetat. Die Reaktion wird bei 80 °C 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vacuum eingeeengt und das Produkt mit präparativer HPLC gereinigt. Das Produkt wird gefriergetrocknet und mit LC-MS und NMR charakterisiert.

N-Acetyl-L-phenylalanyl(S)-(1S)-benzyl-(1-methyl-5-isobutylisoxazol-3-yl)methylamine (84a)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=0.90 (d, 3H, J = 7.3, CH₃ isobutyl), 0.95 (d, 3H, J = 7.3, CH₃ isobutyl), 1.40-1.56 (m, 3H, CH-(CH₃)₂, CH₂-CH-(CH₃)₂), 2.16 (s, 3H, CH₃CO), 2.9-3.1 (m, 4H, C^{β1,β1',β2,β2'}H Benzyl, Phe), 4.1 (dd, 1H, J = 9.8, 3.7, C^αH Phe), 4.09 (dd, J = 14.6, 4.9, 1H, C^αH Benzyl), 7.11-7.39 (m, 11H, Benzyl, Phe, isoxazole), 6.3 (s, 1H, NHI), 7.6 (s, 1H, NHII).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ =22.0, 22.1, 28.9, 35.9, 37.2, 48.6, 60.1, 85.7, 126.2, 127.9, 128.0, 128.1, 129.0, 129.1, 135.9, 137.0, 164.9, 173.3, 173.6.

HRMS: gerechnet [(M+H⁺)]=[C₂₆H₃₄N₃O₃] 436.2831; gemessen 436.2832 m/z. (Ausbeute >68 %); (Reinheit vom Rohprodukt 80 %).

**(84b)**

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ=1.71 (s, 3H, CH₃CO), 2.61-2.65 (m, 2H, C^{β1,β2}H Benzyl, Phe), 2.86-3.04 (m, 2H, C^{β1,β2}H Phe), 4.49-4.50 (m, 1H, C^αH Benzyl), 5.15-5.18 (dd, 1H, J = 15.9, 7.3, C^αH Phe), 5.25-5.28 (m, 1H, NH_I), 6.77 (s, 1H, Olefin)-6.83 (s, 1H, Olefin), 7.06-7.40 (m, 14H, arom.), 7.94 (s, 1H, NH_{II}), 8.39 (s, 1H, OH).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ =22.3, 30.6, 53.6, 53.6, 64.9, 64.9, 115.1, 115.4, 125.9, 126.1, 126.3, 127.5, 127.5, 127.9, 128.0, 128.1, 128.9, 128.9, 128.9, 129.0, 129.2, 137.8, 137.8, 168.9, 170.6, 170.8, 206.4, 207.1.

¹⁹F-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ =-111.74, -74.77.

HRMS: gerechnet [(M+H⁺)]=[C₂₈H₂₈ClFN₃O₃] 508.1830; gemessen 508.1833 m/z. (Ausbeute >85%); (Reinheit vom Rohprodukt 90%).

6.4.1.4 Allgemeine Vorschrift der Peptidyl Diazepinsynthese **(85)** ausgehend vom Peptidyl-Vinylketon **(58)**

Peptidyl-Vinylketon **58** (0.11 mmol, 1 eq.) wird in Ethanol gelöst, anschließend gibt man 5-6 µL Et₃N und das in Ethanol gelöste 1,2-diaminobenzol (0.16 mmol, 1,5 eq.) (0.3 ml) wird dazugegeben. Die Reaktion läuft unter Rückfluß 12 Stunden. Das Ethanol wird unter Vacuum am Rotationsverdampfer eingeengt und Rohprodukt über eine präparative HPLC gereinigt. Das reine isolierte Produkt wird gefriergetrocknet und mit LC/MS und NMR charakterisiert.

- Bei der NMR-Analytik werden hier die Werte für ein Diastereomer angegeben

***N*-Acetyl-L-leucinyln-benzyl-1-[2-(2-chloro-6-fluorophenyl)-1*H*-1,5-benzodiazepine-4-yl)methylamin (85a)**

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ=0.67-0.765 (m, 6H, C^{δ1,δ2}H₃ Leu), 1.68-1.72 (m, 2H, C^βH₂ Leu), 1.96 (s, 3H, CH₃CO), 2.12-2.24 (m, 2H, C^{β1,β2}H₂ Benzyl), 2.86-2.96 (m, 2H, CH₂ diazepin), 3.68 (s, 1H, NH), 4.21-4.29 (m, 1H, C^αH, Leu), 5.26-5.32 (dd, 1H, C^αH, Benzyl), 6.21-6.29 (m, 1H, CH, diazepin), 6.7-7.6 (m, 12H, arom.).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ=21.1, 22.2, 30.7, 43.1, 43.3, 46.3, 47.1, 62.636, 78.5, 78.9, 79.4, 104.3, 122.4, 128.3, 129.1, 129.5, 130.1, 139.7, 147.1, 147.7, 152.3; HRMS: gerechnet [(M+H⁺)]=[C₃₁H₃₂ClFN₄O₂] 547.2459; gemessen 547.2451 m/z. (Ausbeute 48 %); (Reinheit vom Rohprodukt 80 %).

***N*-Acetyl-L-phenylalanyl-isopropyl-1-[2-(2-chloro-6-fluorophenyl)-1*H*-1,5-benzodiazepine-4-yl)methylamin (85b)**

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=1.15 (d, 6H, C, ^{γ1,γ2}H₃ isopropyl), 1.21-1.30 (m, 1H, C^βH isopropyl), 1.9 (s, 3H, CH₃CO), 2.75-2.80 (m, 2H, C^{β1,β2}H₂ Phe), 2.95-3.10 (m, 2H, CH₂, diazepine), 4.17-4.24 (m, 1H, C^αH Phe) 4.75 (d, 1H, C^αH isopropyl), 4.08-5.04 (m, 1H, CH, diazepine), 6.8-7.9 (m, 12H, arom.).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ=18.6, 18.7, 19.7, 22.9, 36.0, 37.1, 42.6, 54.8, 62.7, 111.6, 113.7, 120.3, 126.1, 127.3, 127.6, 128.8, 129.1, 129.2, 131.4, 135.2, 135.7, 136.3, 139.9, 140.3, 141.1, 151.8, 152.7, 184.4.

HRMS: calcd [(M+H⁺)]=[C₃₀H₃₃ClFN₄O₂] 534.2133; found 534.2140 m/z. (Ausbeute 50 %); (Reinheit vom Rohprodukt 40 %).

6.4.1.5 Peptidyl-2,3-Dihydro-Thiazepinen (86)

Das Peptidyl-Vinylketon **58** (0.11 mmol, 1eq.) wird in Ethanol (1 ml) gelöst, anschließend gibt man 5-6 µL AcOH. Dazu wird das in Ethanol (0.3 ml) gelöstem Aminothiophenol (0.33 mmol, 3.0 eq.) wird dazugegeben. Die Reaktion läuft unter Rückfluß 12 Stunden. Das Ethanol wird anschließend unter Vacuum am Rotationsverdampfer eingengt und das Rohprodukt über eine präparative HPLC gereinigt. Das reine isolierte Produkt wird gefriergetrocknet und mit LC/MS und NMR charakterisiert.

***N*-Acetyl-L-phenylalanyl-isopropyl-1-(7-chloro-2,3-dihydro-2-(thiophen-2-yl)-benzo[1,4]thiazepine-4-yl)methylamin (86a)**

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=0.78 (d, 3H, C^{γ1}H₃, J = 6.10 isopropyl), 0.94 (d, 3H, C^{γ2}H₃, J = 6.11 isopropyl), 1.98 (s, 3H, CH₃CO), 1.99-2.03 (m, 1H, C^βH isopropyl), 2.60-2.82 (m, 2H, C^{β1,β2}H₂, Phe), 3.02-3.14 (m, 2H, CH₂CH-S), 5.07-5.16 (dd, 1H, J = 6.11, 6.10, CH-S), 5.26-5.35 (m, 1H, C^αH isopropyl), 6.5 (d, 1H, CH, J = 8.55 thiophen), 6.69 (t, 1H, CH, thiophen), 6.9-7.3 (m, 9H, arom.), 7.5 (bs, NH_I).

HRMS: Theorie [(M+H⁺)]=[C₂₈H₃₁ClN₃O₂S₂] 541.1571; gemessen 541.1589 m/z. (Ausbeute 52%); (Reinheit vom Rohprodukt 80%).

***N*-Acetyl-L-leuciny-benzyl-1-(7-chloro-2-(2-chloro-6-fluorophenyl)-2,3-dihydrobenzo[1,4]thiazepine)methylamin (86b)**

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=0.81-0.92 (m, 6H, C^{δ1,δ2}H₃ Leu), 1.22-1.35 (m, 2H, C^{β1,β2}H₂, Leu), 1.48-1.65 (m, 1H, C^γH Leu), 1.73 (s, 3H, CH₃CO), 2.64-2.74 (m, 2H, C^{β1,β2}H₂ Benzyl), 3.06-3.36 (m, 2H, CH₂CH-S), 3.97 (d, 1H, C^αH, Leu), 5.05-5.16 (m, 2H, C^αH Benzyl, CH-S), 5.94 (bs, NH_I), 6.54-7.47 (m, 11H, arom.).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ=22.9, 24.8, 38.7, 40.9, 43.1, 44.7, 52.1, 58.6, 60.8, 114.7, 114.8, 119.3, 122.2, 123.0, 123.7, 126.1, 126.3, 126.9, 128.1, 128.5, 128.9, 130.1, 131.6, 132.8, 133.3, 137.1, 153.8, 154.7, 160.5, 167.5, 182.5.

HRMS: gerechnet [(M+H⁺)]=[C₃₁H₃₃Cl₂FN₃O₂S] 601.1681, gefunden 601.1692 m/z. (Ausbeute 50 %); (Reinheit vom Rohprodukt 55 %).

***N*-Acetyl-L-phenylalanyl-isopropyl-1-(7-chloro-2-(2-chloro-6-fluorophenyl)-2,3-dihydrobenzo[1,4]thiazepine)methylamin (86c)**

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=0.7-0.8 (m, 3H, C^{γ1}H₃ isopropyl), 0.85-0.95 (m, 3H, C^{γ2}H₃ isopropyl), 1.97-2.07 (m, 1H, C^βH isopropyl), 1.97 (s, 3H, CH₃CO), 2.43-2.60 (m, 2H, C^{β1,β2}H₂ Phe), 2.95-3.16 (m, 2H, CH₂CH-S), 4.39-4.50 (m, 1H, C^αH Phe), 4.62-4.70 (m, 1H, CH-S), 4.75-4.90 (d, 1H, C^αH isopropyl), 6.5-7.5 (m, 11H, arom.).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ=18.5, 19.3, 22.8, 25.2, 30.4, 30.9, 35.9, 36.9, 38.2, 53.4, 54.7, 62.4, 114.9, 115.2, 122.2, 122.3, 122.8, 126.0, 126.3, 129.2, 129.3, 130.1, 132.7, 135.5, 135.9, 136.0, 154.2, 162.3, 163.5, 169.2, 171.3.

HRMS: gerechnet [(M+H⁺)=C30H31Cl2FN3O2S] 586.1524; gemessen 586.1532 m/z.
(Ausbeute 75 %); (Reinheit vom Rohprodukt 78 %).

***N*-Acetyl-L-phenylalanyl-benzyl-1-(2,3-dihydro-2-isobutylbenzo[1,4]thiazepine)methylamine (86d)**

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=0.87 (d, 3H, J = 7.3, CH₃ isobutyl), 0.93, (d, 3H, J = 7.3, CH₃ isobutyl), 1.42-1.60 (m, 1H, CH₂ isobutyl), 1.81-2.20 (m, 5H, CH(CH₃)₂, CH₂CH(CH₃)₂, CH₃CO), 2.82-3.18 (m, 6H, C^{β1,β2}H₂ Benzyl, C^{β1,β2}H₂ Phe, CH₂CH-S), 4.70 (m, 1H, CH-S), 4.03 (dd, 1H, J = 14.6, 6.1, C^αH Phe), 5.60 (dd, J = 15.9, 7.3, 1H, C^αH Benzyl), 7.04-7.37 (m, 13H, arom CH), 7.82 (d, J = 7.3, arom CH), 4.16 (d, 1H, J = 6.1, NH_I), 8.32 (bs, 1H, NH_{II}).

HRMS: gerechnet [(M+H⁺)]=[C₃₂H₃₆N₃O₂S] 528.2409; gefunden 528.2421 m/z. (Ausbeute 63 %); (Reinheit vom Rohprodukt 60 %).

***N*-Acetyl-L-phenylalanyl-benzyl-1-(2-(2-chloro-6-fluorophenyl)-2,3-dihydrobenzo[1,4]thiazepine)methylamine (86e).**

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=2.02 (s, 3H, CH₃CO), 2.90-3.18 (m, 5H, C^{β1,β2}H₂ Benzyl, C^{β1,β2}H₂ Phe, CH₂CH-S), 4.70-4.82 (m, 2H, CH₂CH-S, CH-S), 5.04 (dd, 1H, J = 13.4, 7.3, C^αH Phe), 5.39 (dd, J = 14.6, 7.3, 1H, C^αH Benzyl), 7.06-7.58 (m, 16H, arom.), 7.85 (d, 1H, J = 7.3, arom.), 6.18 (bs, 1H, NH_I), 8.08 (s, 1H, NH_{II}).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ=22.2, 35.3, 35.3, 37.7, 39.2, 48.9, 54.8, 54.9, 59.5, 114.4, 114.8, 117.9, 118.2, 121.2, 122.1, 125.8, 125.8, 126.5, 126.9, 128.3, 128.3, 128.4, 128.5, 128.5, 128.6, 128.7, 128.8, 129.0, 129.1, 129.8, 129.9, 131.3, 136.4, 151.4, 155.3, 158.5, 163.2, 173.2, 173.3..

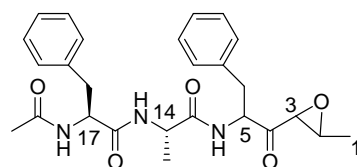
HRMS: calcd [(M+H⁺)]=[C₃₄H₃₂ClFN₃O₂S] 601.1845; found 601.1852 m/z. (Ausbeute 71 %); (Reinheit vom Rohprodukt 64 %).

6.4.2 Oxiransynthese (88)

Peptidyl-1-amino-3-buten-4-one **58h** (10 mg, 0.022 mmol) wird in wasserfreiem DCM in einem Stickstoffkolben gelöst. Dazu gibt man bei 0°C unter Stickstoff vorsichtig DMDO in Aceton (0.044 mmol, 2 eq). Nach einer Stunde bei 0°C läuft die Reaktion bei RT weitere 4 Stunden. Das DMDO und das Lösungsmittel wird vorsichtig bei RT im Vacuum

eingengt und anschließend das Rohprodukt mit der präparativen HPLC gereinigt. Das Produkt wird gefriergetrocknet mit LC-MS und NMR charakterisiert.

HRMS: calcd [(M+H⁺)]=[C₂₆H₃₁N₃O₅] 4.66.2264; found 466.2201 m/z. (Ausbeute 40 % je ein isoliertes Produkt); (Reinheit vom Rohprodukt 95 %).



(88)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.03 (d, 3H, C^βH₃, Ala C15), 1.14-1.16 (d, 3H, Oxiran C1), 1.72-1.73 (s, 3H, CH₃CO C26), 2.6-2.7 (m, 2H, C^{β1β2}H₂ Phe C6), 2.84-2.90 (m, 2H, C^{β1β2}H₂ Phe C18), 2.92-2.93 (m, 1H, CH-oxiran, C3), 3.12-3.13 (m, 1H, CHCH₃-oxiran), 4.26-4.27 (m, 1H, C^αH, Phe C5), 4.48-4.49 (m, 1H, C^αH, Phe C17), 4.6-4.65 (m, 1H, C^αH, Ala C14), 7.14-7.24 (m, 10, Phe C7-C11, Phe C19-C24), 8.02-8.06 (d, 1H, NH_I, Phe), 8.12-8.13 (d, 1H, NH_{II}, Ala), 8.33-8.39 (d, 1H, NH_{III}, Phe-Ac).

6.5 Synthese von *N*-acylierten Sphingosinen (93a-c)

6.5.1 Synthese von *N*-acylierten Ketosphingosinen (91a-c)

Synthese von 1-Tetradecanal (94)

Zum Tetradecanol (214 mg, 12.5 mmol) gelöst in EtOAc gibt man bei RT frisch vorbereitetes IBX (37,5 mmol, 10.0 g, 3.0 eq). Anschließend wird 2-3 Stunden unter Rückfluß gerührt und immer wieder mit DC den Reaktionsablauf auf Vollständigkeit kontrolliert. Das Produkt in EtOAc wird abfiltriert und der Filterkuchen wird 2x mit EtOAc je 10 ml gewaschen. Das EtOAc wird unter Vacuum eingengt. Der Aldehyd wird gefriergetrocknet und mit MS, DC und NMR charakterisiert. Das Produkt wird unter Stickstoff gekühlt gelagert.

Ausbeute=2.39 g entspricht 96%

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.86 (t, 3H, $J=7.3$ Hz), 1.25 (s, 22H), 1.26 (m, 2H), 2.35 (m, 2H), 9.75 (t, 1H, $J=2.4$ Hz).

¹³C-NMR (75.49 MHz, CDCl₃) δ 14.52, 22.52, 23.11, 25.11, 29.48, 29.65, 29.77, 30.05, 32.36, 34.36, 44.34, 203.04.

Wittig-Abspaltung mit verschiedenen Aldehyden zu den geschützten Ketosphingosinen 90a-c.

Die Wittig-Abspaltung wird analog (Kap.3.2) bei 60°C durchgeführt. Die Produkte werden mit Hilfe der Säulenchromatographie (Hexan/EtOAc 1:1, v:v) gereinigt. Die Verbindungen werden mit Ms, DC, und NMR charakterisiert.

N-Acetyl-(S,E)-1-*tert*-butoxy-3-oxooctadec-4en-2-yl-amin 90a

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 0.86 (t, 3H, $J=7.3$ Hz), 1.07-1.5 (m, 31 H), 2.02 (s, 3H), 2.2-2.23 (m, 2H) 3.54-3.60 (dd, 1H, $J=9.2$ Hz, 9.3 Hz), .3.72-3.75 (dd, 1H, $J=8.5$ Hz, 9.7 Hz), 4.85-4.90 (m, 1H), 6.52 (d, 1H, $J=7.3$ Hz), 6.90-7. 10 (m, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 13.61, 22.19, 22.72, 24.40, 26.74, 27.52, 28.81, 28.70, 28.86, 28.90, 29.03, 29.08, 29.10, 29.15, 29.20, 31.42, 32.16, 56.62, 61.53, 72.85, 126.24, 149.05, 169.37, 195.60.

N-Acetyl(1S,3E,5E)-1-(*tert*-butoxymethyl)-2-oxohepta-3,5-dienyl-amin 90b.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.24 (s, 9H), 2.0 (d, 3H, $J=4.8$ Hz), 2.20 (s, 3H), 3.65-4.05 (bs, 2H).

¹³C-NMR (75.49 MHz, CDCl₃) δ 18.44, 22.82, 26.79, 56.93, 61.53, 72.95, 123.55, 129.81, 141.35, 144.12, 187.92.

Isoliertes Produkt (49.0%).

N.Acetyl-1S-3E-1-(tert-butoxymethyl)-4-(4-octylphenyl)-2-oxobut-3-enyl-amin 90c.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 0.86 (t, 3H, J=6.1Hz), 1.10 (s, 9H), 1.2-1.4 and 1.6-1.7 (bs, 10H), 2.05 (s, 3H), 2.65 (t, 2H, 7.3Hz), 3.65 (dd, 1H, J=9.7Hz), 3.85 (dd, 1H, J=9.7Hz, 8.55Hz), 4.95 (m, 1H), 6.65 (d, 1H, J=7.3Hz) 6.85 (d, 1H, J=7.3Hz), 7.20 (d, 1H, J=7.3Hz), 7.5 (d, 1H, J=7.3Hz), 7.72 (d, 1H, J=15.8Hz).

¹³C-NMR (75.49 MHz, CDCl₃) δ 13.61, 22.17, 22.80, 26.79, 28.74, 28.82, 31.38, 35.46, 57.13, 61.59, 72.98, 121.33, 128.07, 128.61, 131.35, 143.67, 145.98, 169.32, 195.67.

Isoliertes Produkt (62.0%).

Stereoselektive Reduktion mit Zinkborhydrid.

Frisch vorbereitetes Zinkborhydrid in Ether (193 µL, 2 eq) wird tropfenweise zum vorher auf -78°C gekühlten und in THF versetzten Edukt gegeben. Die Reaktion wird 30 min unter Stickstoff gerührt. Die Kontrolle der Reaktion auf Vollständigkeit wird mit DC durchgeführt. Nach Vollständigkeit der Reduktion wird erst mit Wasser gequentscht, dann wird 1N HCl dazu gegeben. Zur Mischung wird anschließend Hexan, dann wird 1N NaOH dazu gegeben bis der PH-Wert 10 erreicht ist. Es wird mit Chloroform (3x), Brine (3x) extrahiert und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer eingengt und anschließend das Produkt gefriergetrocknet. Das Produkt wurde mit MS, DC, und NMR analysiert.

Stereoselektive Reduktion mit L-Selectride.

Die Reduktion mit L-Selectride wird genau wie die Reduktion mit LiAlH(O-tBu)₃ durchgeführt. Das Produkt wurde anhand MS, DC, und NMR analysiert.

Stereoselektive Reduktion mit LiAlH(O-tBu)₃.

Das Ketosphingosin (60 mg, 0.15 mmol) wird unter Stickstoff in absolut getrocknetem Ethanol gelöst und auf -78°C gekühlt. Man gibt tropfenweise LiAlH(O-tBu)₃ (75.7 mg, 0.29 mmol, 2 eq) unter Stickstoff innerhalb von zwei min dazu. Um das Olefin nicht zu reduzieren wird die Reaktion nach 15 min. gestoppt. Die Mischung wird mit 10%er Zitronensäure behandelt anschließend gibt man EtOAc dazu. Extrahiert wird mit Brine,

dann Wasser. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und die Substanz anschließend gefriergetrocknet. Das Produkt wird mit MS, DC, und NMR analysiert.

(4E)-2-(acetylamino)-2,4,5-trideoxy-5-(4-octylphenyl-D-erythro-pent-4-en-ol 92a

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 0.86 (t, 3H, *J*=5.9Hz), 1.19 (s, 9H), 1.27-1.30, 1.55-1.60 (bs, 12 H), 2.05 (s, 3H), 2.56-2.62 (t, 3H, *J*=8.55Hz), 3.54-3.57 (dd, 2H, *J*=10.1Hz), 3.77-3.80 (dd, 2H, *J*=9.66Hz), 4.10-4.17 (dd, 1H, *J*=8.53Hz), 4.40-4.45 (bs, 1H), 6.17-6.24 (dd, 1H, *J*=17.09Hz), 6.36-6.39 (d, 1H, *J*=8.55Hz), 6.67-6.72 (d, 1H, *J*=15Hz), 7.13-7.15 (d, 2H, *J*=7.33Hz), 7.26-7.31 (d, 2H, 8.55Hz).

¹³C-NMR (75.49 MHz, CDCl₃) δ 13.66, 22.23, 23.01, 26.93, 28.81, 28.90, 31.45, 35.26, 51.69, 61.86, 73.84, 74.52, 125.94, 127.88, 128.22, 130.37, 133.68, 142.23.

Abspaltung der tBu-Schutzgruppe mit TFA.

Das Ketosphingosin wird in DCM gelöst. Eine Mischung aus TFA/Wasser 95:5, v:v wird unter Rühren bei RT langsam dazugegeben. Eine DC wird aufgenommen, um den Reaktionsverlauf zu kontrollieren. Nach einer Stunde wird evaporiert, dann gefriergetrocknet. Die Produkte wurden mit DC und NMR charakterisiert.

N-Acetyl-(2S-4E)octadecen-1,(3R)-diol amin 93b

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 0.86 (t, 3H, *J*=7.3 Hz), 1.24-1.5 (m, 31 H), 2.03 (m, 5H), 2.06 (s, 2H) 2.75 (bs, 1H), 3.69-3.70 (d, 1H, *J*=10.99 Hz), .3.90-3.99 (d, 1H, *J*=3.66 Hz), 4.30-4.35 (t, 1H), 5.50-5.57(dd, 1H, *J*=6.11 Hz, *J*=7.33 Hz) 5.74-5.82 (m, 1H), 6.32-6.34 (d, 1H, *J*=6.11 Hz).

6.6 Peptidyl-bis(amino)-pent-3-en-2-on (Diaminopentenone) 104

6.6.1 Synthese von Aminosäurealdehyde

Der folgende Syntheseweg wurde erfolgreich für die Oxidation von Fmoc-Phe-ol und Fmoc-Leu-ol angewendet.

Allgemeine Vorschrift:

Fmoc-aminoalkohol (1 mmol, 1 eq.) wird in einem 500 ml-Kolben in wasserfreiem DCM (200 ml) gelöst. Zur Lösung wird das frisch vorbereitete DESS-MARTIN-Periodinan (2.1 mmol, 2.1 eq.) gegeben, welches sich mit leichtem Schleier löst. Die Reaktion wird durch Zugabe von Wasser (50 μ l, 2.1 eq.) gestartet und der Ansatz bei RT gerührt, wobei die Lösung zunehmend milchig wird. Nach 15 min wird weiteres DESS-MARTIN-Periodinan (0.60 mg, 0.14 mmol, 0.13 eq.) und Wasser (2.5 μ l, 0.14 mmol, 0.13 eq.) zugesetzt und eine weitere Stunde bei RT gerührt. Der Ansatz wird mit Diethylether (30 ml) verdünnt. Natriumthiosulfat-Pentahydrat (2.98 g, 12.24 mmol, 11.22 eq.) wird in 80 %-gesättigter NaHCO₃-Lösung (30 ml) gelöst, zur Reaktionsmischung gegeben und 30 min gerührt, wobei die milchige Suspension in eine klare Lösung übergeht. Die wässrige Phase wird mit Diethylether (60 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (1x 40 ml), Wasser (2x 40 ml) und gesättigter Kochsalzlösung (2x 40 ml) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und den Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das laut DC sehr saubere Produkt wird ohne weitere Aufreinigung in dieser Form verwendet (Racemisierungsgefahr an Kieselgel).

Ausbeute: 387 mg (98 %) einer farblosen Substanz

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +54.2^\circ$

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 9.56$ (s, 1H), 7.69 (d, ³J = 7.58 Hz, 2H), 7.47 (t, ³J = 7.58 Hz, 2H), 7.33 (t, ³J = 7.45 Hz, 2H), (bs, 1H), 2.40-2.60 (m, 1H), 2.25-2.35 (m, 1H), 2.11-2.15 (m, 2H), 1.75-1.90 (m, 1H), 1.31-1.41 (m, 1H)

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): $\delta = 146.31, 129.23, 127.81, 126.52, 73.05, 69.97, 66.09, 56.11, 33.53$

6.6.2 Wittig Abspaltung zum Diaminopentenone (**104**)

Analog zur allgemeinen Prozedur (Kap.3.2) wird erst das Peptidylacylphosphoran (**125**) (0.5 g, 0.8 mmol) nach dem etablierten Synthesekonzept (Abb. 22) hergestellt. Der frisch vorbereitete Aminosäurealdehyd wird in trockenem THF gelöst und unter Stickstoff zum Harz gegeben. Die Reaktionsmischung wird bei 60°C für 12h gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt präparativ gereinigt. Das gereinigte Produkt wurde anschließend mit LC-MS und NMR charakterisiert.

Exemplarisch-NMR: (**104a**)

9H-fluoren-9-ylmethyl (1R,2E,5S)-5-[(N-acetyl-L-phenylalanyl)amino]-1-benzyl-4-oxo-6-phenylhex-2-enylcarbamate

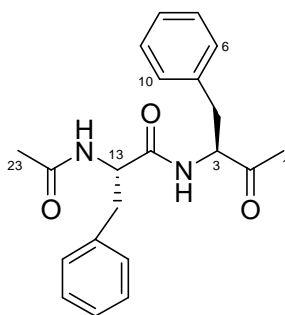
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 1.78 (s, 1H, CH₃CO), 2.94-3.08 und 3.09-3.14 (m, 6H, C^{β1,β1}H₂ benzyl 1, C^{β1,β1}H₂ benzyl 2, C^{β1,β1}H₂, C^{β1,β1}H₂Phe), 3.83 (bs, 1H, C^αH benzyl 1), 4.28-4.30 (t, 1H, CH-Fmoc), 4.52-4.53 (d, 2H, J=7.33Hz, CH₂-Fmoc), 4.58-4.65 (m, 1H, C^αH benzyl 2), 4.70-4.75 (m, 1H, Phe), 5.91-5.94 und 6.10-6.11 (dd, 1H, J=15 Hz, J= 6.71 Hz), 6.50-6.51 (d, 1H, CH-vinyl, J= 7.32 Hz), 6.88-7.90 (m, 23 H, aromatisch).

6.7 Allgemeine Prozedur für die Synthese von Peptidylketone (110, 112)

6.7.1 Synthese von Peptidylmethylketon (110) über die basische Hydrolyse

Peptidyl-3-amino-2-oxo-1-phosphoranylidopropan Harz **103** (0.5 mg, 1.6 mmol/g, 0.8 mmol) wird in THF suspendiert. Dazu gibt man NaHCO_3 -Lösung (pH-Wert = 9). Das Reaktionsgemisch wird 8 h bei 60°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wird in eine Plastikspritze mit Filter überführt und das Produkt wird abfiltriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt mit LC-MS und NMR analysiert.

N-Acetyl-L-phenylalanyl-(1S)-benzyl-propan-2-on (110)



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.94 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO}$, C23), 2.02 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO}$, C1), 2.86-3.07 (m, 4H, $\text{C}^{\beta 1, \beta 2}\text{H}_2$, Phe C4, $\text{C}^{\beta 1, \beta 2}\text{H}_2$, Phe C14), 4.60-4.72 (m, 2H, C^αH , Phe C3, C^αH , Phe C13), 5.97-5.99 (d, 1H, NH_I Phe), 6.31-6.33 (d, 1H, NH_II Phe), 6.96-7.27 (m, 10H, Phe C5-C10, Phe C15-C20).

6.7.2 Synthese vom Peptidylethylketon (**112**) über die Alkylierung von (**103**) und anschließende basische Hydrolyse

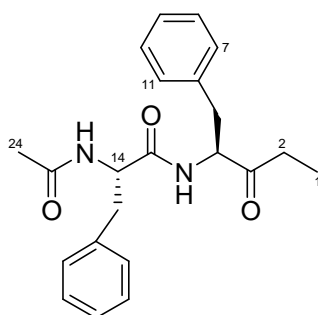
Alkylierung und anschließende Deprotonierung

Peptidyl-3-amino-2-oxo-1-phosphoranylidopropan-Harz (200 mg, 0.32 mmol/g, 0.06 mmol) wird in THF suspendiert. Dazu gibt man MeI (0.19 mmol, 3eq) und lässt die Reaktion bei RT 12 h schütteln. Das Harz wird mit THF (3x), DMF (3X), und DCM (3x) gewaschen. Das Harz wird mit THF (3x), DMF (3X), und DCM (3x) gewaschen.

Basische Hydrolyse zum Peptidylethylketon (**112**)

Das alkylierte Harz wird mit THF suspendiert. Dazu gibt man $\text{NaHCO}_3/\text{H}_2\text{O}$ zur Reaktion bis der PH-Wert 9 erreicht ist. Die Reaktion wird für 8 h bei 50°C geschüttelt. Die Reaktion wird in eine Plastikspritze mit Filter überführt und das Produkt wird abfiltriert. Das Harz wird zwei mal je 5 min. gewaschen und das restliche Produkt abfiltriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt mit LC/MS und NMR analysiert.

N-Acetyl-L-phenylalanyl-(1S)-benzyl-butan-2-on (**112**)



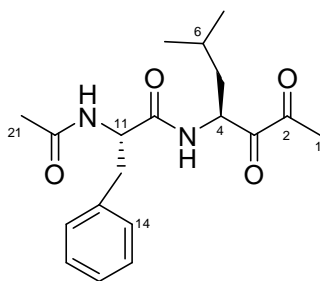
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ =0.95-0.99 (t, 3H, CH_3CH_2 , C1), 1.97 (s, 3H, CH_3CO , C24), 2.23-2.29 (m, 2H, CH_2CH_3 , C2), 2.80-3.06 (m, 4H, $\text{C}^{\beta 1, \beta 2}\text{H}_2$, Phe C16-C20, $\text{C}^{\beta 1, \beta 2}\text{H}_2$, Phe C6-C10), 4.58-4.68 (m, 2H, C^αH , Phe C13, C^αH , Phe C3), 5.94-6.96 (d, 1H, NH_I Phe), 6.25-6.30 (d, 1H, NH_{II} Phe), 6.97-7.22 (m, 10H, Phe C6-C11, Phe C16-C21).

HRMS: Theorie $[(M^+)]=[C_{22}H_{26}N_2O_3]$ 367.1953; gemessen 367.1925 m/z. (Ausbeute 45 %); (Reinheit vom Rohprodukt 95 %).

6.8 Allgemeine Vorschrift für die Synthese von Peptidyl diketone (106)

Peptidyl-3-amino-2-oxo-1-phosphoranyliden propan Harz (0.5 mg, 1.6 mmol/g, 0.8 mmol) wird analog (Kap. 4.8.2) alkyliert und anschließend mit DMDO für 1h bei RT vom Harz oxidativ abgespalten. Das Rohprodukt wird mit LC/MS und NMR charakterisiert.

N-Acetyl-L-phenylalanyl-(1S)-isobutyl-butan-2,3-dion (106a)



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ =0.84-0.86 (d, 6H, CH₃, CH₃ leu, C7, C8), 1.24-1.50 (m, 3H, C^{β1}H₂, C^γH leu, C5, C6), 1.95 (s, 3H, CH₃-CO, C21), 2.30 (s, 3H, CH₃-diketon C1), 2.98-3.05 (m, 2H, C^{β1}, β²H, Phe C12), 4.67-4.74 (dd, 1H, C^αH, Leu C4), 4.86-4.93 (m, 1H, C^αH, Phe C11), 6.40-6.43(d, 1H, NH_I Phe), 6.60-6.62 (d, 1H, NH_{II} Phe), 7.16-7.29 (m, 5H, Phe, C13-C18)

HRMS: Theorie [(M⁺)]=[C₁₉H₂₆N₂O₄] 347.1893; gemessen 347.1825 m/z. (Ausbeute 73 %); (Reinheit vom Rohprodukt 95 %).

7 Literaturverzeichnis

- [1] S. E. Radford, C. M. Dobson, *Cell* ,**1999**, 97, 291-298; C. M. Dobson, *Nature* **2003**, 426, 884-890; J. Gante, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, 33, 1699–1720; A. D. Abell, *Lett. Pep. Sci.* **2002**, 8, 267-272.
- [2] S. Weik, J. Rademann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 2491-2494.
- [3] S. Weik, T. Luksch, A. Evers, J. Böttcher, C. A. Sotriffer, A. Hasilik, H.-G. Löffler, G. Klebe, J. Rademann, *ChemMedChem* **2006**, 1, 445-457.
- [4] A. El-Dahshan, S. Weik, J. Rademann, *Org. Lett.* **2007**, 9, 949-952.
- [5] J. F. Lynas, P. Harriott, A. Healy, M. A. McKervey, B. Walker, *Bioorg. Med. Lett.* **1998**, 373-378.
- [6] J. F. Lynas, S. L. Martin, B. Walker, *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, 53, 473-480.
- [7] H. Angkliker, *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 4014-4018.
- [8] P. Raddatz, A. Janczyk, K.-O. Minck, F. Rippmann, C. Schittenhelm, C. J. Schmitges, *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 3525-3536.
- [9] B. E. Maryanoff et al., *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 3865-3876.
- [10] Nicholson DW, *Nature* **2000**, 407, 810-816.
- [11] M. E. Jung, J. J. Clemens, N. Suree, C. K. Liew, R. Pilpa, D. O. Campbell, R. T. Clubb, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 15, 5076-5079.
- [12] C. J. Scott, A. McDowell, S. L. Martin, J. F. Lynas, K. Vandebroek, B. Walker, *Biochem. J.* **2002**, 366, 953-958.
- [13] B. Gentil, F. Grimot, C. Riva, *Mol. Cell. Biochem.* **2003**, 254, 203-210.
- [14] P. J. Hartfield, G. C. Mayne, A. W. Murray, *FEBS Lett.* **1997**, 401, 148-152.
- [15] K. Shikata, H. Niuro, H. Azuma, K. Ogino, T. Tachibana, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 2723-2728.
- [16] A. Baldisserotto et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 1849-1854.
- [17] R. Ettari, E. Nizi, M.-A. Dude, G. Pradel, R. Vicik, T. Schirmmeister, N. Micale, S. Grasso, M. Zappala, *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 988-996.
- [18] T. Mathieu, C. Francois, E. Gwilherm, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 1270–1281.
- [19] H. Takahiro, K. Daisuku, A. Yki, M. Hiroshi, S. Masahiko, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 34-40.
- [20] J. Szostak, F. P. Seebeck, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 7150-7151.
- [21] Mathieu, T.; Francois, C.; Gwilherm, E. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 1270–1281.
- [22] C. Zhu, P. Tang, B. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **2008** .in press.
- [23] A. J., Souers, J. A. Ellman, *Tetrahedron* **2001**, 57, 7431-7448.
- [24] A. Giannis, T. Kolter, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 1303-1326.
- [25] J. I. Garvilyuk, E. Ghotas, R. A. Batey, *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 237-246.
- [26] C.-M. Park, C. Sun, E. T. Olejniczak, A. E. Wilson, R. P. Meadows, S. F. Betz, S. W. Elmore, S. W. Fesik, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 771–775; Y. Yu, J. M. Ostresh, R. A. Houghten, *J. Comb. Chem.* **2002**, 4, 484-490; R. G. Franzen, J. M. Ostresh, R. A. Houghten, *J. Comb. Chem.* **2000**, 2, 195-214.
- [27] E. Biron, J. Chatterjee, H. Kessler, *Org. Lett.* **2006**, 8, 2417-2420.
- [28] W. C. Tornoe, J. Sanderson, J. C. Mottram, G. H. Coombs, M. Meldal, *J. Comb. Chem.* **2004**, 6, 312-324.

- [29] A. P Combs et al., *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6544-6548.
- [30] D. F. McComsey, M. J. Hawkins, P. Andrade-Gordon, M. F. Addo, D. Oksenberg, B. E. Maryanoff, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1423-1428.
- [31] G. R. Pettit, F. Hogen, D. L. Herald, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4019-4022.
- [32] A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner, *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, **1998**.
- [33] H. J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi, *Wirkstoffdesign. Der Weg zum Arzneimittel*, Spektrum Akademischer Verlag, **1996**.
- [34] L. Schechter und A. Berger, *On size of active site in proteases .I Papain*, *Biochem. Biophys. Res. Com.* **1967**, *27*, 157-162.
- [35] D. Seebach, *Angew. Chem.* **1969**, *81* 690-700.
- [36] D. Seebach, *Angew. Chem.* **1979**, *91* 259-278.
- [37] R. E. Gawley, Q. Zhang, A. T. McPhail, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11* 2093-2106.
- [38] N. Kise, T. Urai, J.-I. Yoshida, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9* 3125-3128.
- [39] R. M. Adlington, J. E. Baldwin, J. C. Bottaro, M. W. D. Perry, *Chem. Commun.* **1983**, 1040-1041.
- [40] J. E. Baldwin, J. C. Bottaro, J. N. Kolhe, R. M. Adlington, *Chem. Commun.* **1984**, 22-23.
- [41] R. Brehme, H. E. Nikolajewski, *Tetrahedron* **1969**, *25* 1159-1163; R. Brehme, H. E. Nikolajewski, *TETRAHEDRON* **1976**, *32* 731-736; R. Brehme, H. E. Nikolajewski, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23* 1131-1134; R. Brehme, B. Stroede, *J. Prakt. Chem.* **1987**, 246-258; R. Brehme, A. Klemann, *Tetrahedron* **1987**, *43* 4113-4118; R. Brehme, *Chem. Ber.* **1990**, *123* 2039-2046.
- [42] R. Fernández, J. M. Lassaletta, *Synlett* **2000**, 1228-1240.
- [43] Enders, M. Bolkenius, J. Vázquez, J. M. Lassaletta, R. Fernández, *J. Prakt. Chem.* **1998**, *340* 281-285.
- [44] J. M. Lassaletta, R. Fernández, E. Martín-Zamora, C. Pareja, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37* 5787-5790.
- [45] R. Fernández, E. Martín-Zamora, C. Pareja, M. Alcarazo, J. Martín, J. M. Lassaletta, *Synlett* **2001**, *7*, 1158-1160; R. Fernández, E. Martín-Zamora, C. Pareja, J. M. Lassaletta, *J. Org. Chem.* **2001**, *66* 5201-5207.
- [46] J. M. Lassaletta, R. Fernández, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33* 3691-3694; R. Fernández, C. Gasch, J. M. Lassaletta, J. M. Llera, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35* 471-472; J. M. Lassaletta, R. Fernández, C. Gasch, J. Vázquez, *Tetrahedron* **1996**, *52* 9143-9160; R. Fernández, C. Gasch, J. M. Lassaletta, J. M. Llera, *Synthesis* **1996**, 627; D. Enders, R. Syrig, G. Raabe, R. Fernández, C. Gasch, J. M. Lassaletta, J. M. Llera, *Synthesis* **1996**, 48.
- [47] J. M. Lassaletta, R. Fernández, E. Martín-Zamora, E. Díez, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* 7002-7003; E. Díez, R. Fernández, C. Gasch, J. M. Lassaletta, J. M. Llera, E. Martín-Zamora, J. Vázquez, *J. Org. Chem.* **1997**, *62* 5144-5155; D. Enders, E. Díez, R. Fernández, E. Martín-Zamora, J. M. Munoz, R. R. Pappalardo, J. M. Lassaletta, *J. Org. Chem.* **1999**, *64* 6329-6336; D. Enders, J. Vázquez, *SYNLETT* **1999**, 629-631; D. Enders, J. Vázquez, G. Raabe, *Eu. J. Org. Chem.* **2000**, 893-901.; J. M. Lassaletta, J. Vázquez, A. Prieto, R. Fernández, G. Raabe, D. Enders, *J. Org. Chem.* **2003**, *68* 2698-2703.
- [48] R. Fernández, E. Martín-Zamora, C. Pareja, J. Vázquez, E. Díez, A. Monge, J. M. Lassaletta, *Angew. Chem.* **1998**, *110* 3598-3600; C. Pareja, E. Martín-Zamora, R. Fernández, J. M. Lassaletta, *J. Org. Chem.* **1999**, *64* 8846-8854.
- [49] B. M. Trost, J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* 1044-1046.

- [50] H. Nemoto, Y. Kubota, Y. Yamamoto, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4515-4516.
- [51] H. H. Wasserman, R. W. DeSimone, W.-B. Ho, K. E. McCarthy, K. S. Prowse, A. P. Spada, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 7207-7210.
- [52] H. H. Wasserman, M. D. Xia, A. K. Peterson, M. R. Jorgensen, E. A. Curtis, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6163-6166.
- [53] H. Stetter, G. Dämbkes, *SYNTHESIS* **1977**, 403-404.
- [54] Bandel, H., *Dissertation, Universität Tübingen*, **2000**.
- [55] P. Blakskjaer, B. Hoj, D. Riber, T. Skrydstrup, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *125*, 4030-4031.
- [56] S. Weik T. Luksch, A. Evers, J. Böttcher, A. Hasilik, H.-G. Löffler, G. Klebe, J. Rademann., *ChemMedChem* **2006**, *1*, 445-457.
- [57] T. Yamamoto, H. Hasigawa, T. Hakogi, S. Katsumura, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 24, 5569-5572.
- [58] R. A. Aitken, N. A. Al-Awadi, M. E. Balkovic, H. J. Bestmann, O. Clem, S. Gibson, A. Groß, A. kumar, T. Röder, *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 840-847.
- [59] G. Märkl, *Chem. Ber.* **1961**, *94* 3005; P. A. Chopperd, R. J. Searle, F. H. Devitt, *J. Org. Chem.* **1965**, *30* 1015; G. Doleschall, *SYNTHESIS* **1981**, 478-480; M. P. Cooke Jr., D. L. Burman, *J. Org. Chem.* **1982**, *47* 4955-4963; F. Buzzetti, N. Barbugian, C. A. Gandolfi, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 2505-2508; T. Hiyama, K. Kobayashi, M. Fujita, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 4959-4962.
- [60] H. H. Wasserman, J. Fukuyama, N. Murugesan, J. van Duzer, L. Lombardo, V. Rotello, K. McCarthy, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* 371.
- [61] H. H. Wasserman, V. M. Rotello, D. R. Williams, J. W. Benbow, *J. Org. Chem.* **1989**, *54* 2785.
- [62] S. V. McKinley, J. W. Rakshys, *Chem. Commun.* **1972**, 134-135; J. Westman, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3745-3747; M. H. Bolli, S. V. Ley, *Perkin 1* **1998**, 2243-2246.
- [63] A. B. Charette, A. A. Boezio, M. K. Janes, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3777-3779.
- [64] H. Rehman, J. M. Rao, *Synth. Commun.* **1987**, *17*, 1119-1128.
- [65] B. C. Hamper, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5558-5562.
- [66] F. Zaragoza, H. Stephensen, *J. Org. Chem* **2001**, *66*, 2518-2521.
- [67] H. Wassermann, K. Lee, *Tetrahedron lett.* **2000**, *41*, 2511-2514.
- [68] N. Fuchi, T. Doi, B. Cao, M. Kahn, T. Takahashi, *Synlett* **2002**, 285-289.
- [69] H. H. Wasserman, J. J. Wang, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5581-5586.
- [70] H. Wenschuh, M. Beyermann, R. Winter, M. Bienert, D. Ionesco, L. A. Carpino, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5483-5486.
- [71] L. A. Carpino, A. El-Faham, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 5401.
- [72] J. Nielsen, L. O. Lyngsoe, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8439-8442.
- [73] B. Blankemeyer-Menge, M. Nimtz, R. Frank, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1701-1704.
- [74] J. F. Lynas, S. L. Martin, B. Walker, *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, *53*, 473-480.
- [75] P. Darkins, M. Groarke, M. A. McKervey, H. M. Moncrieff, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 381-389.
- [76] J. Lynas, S. Hawthorne, B. Walker, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1771-1773.
- [77] H. Nakamura, K. Ishihara, H. Yamamoto, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5124-5137.

- [78] R. P. Robinson, L. A. Reiter, W. E. Barth, A. M. Campeta, K. Cooper, B. J. Cronin, R. Destito, K. M. Donahue, F. C. Falkner, *J. Med. Chem* **1996**, *39*, 10-18.
- [79] M. S. McQueney, S. L. Lee, W. H. Swartz, H. L. Ammon, P. S. Mariano, D. Dunaway-Mariano, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 7121-7130.
- [80] H. Venkatesan, M. Greenberg, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 525-529.
- [81] K. A. Scheidt, H. Chen, B. C. Follows, S. R. Chemler, D. S. Coffey, W. R. Roush, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6436-6437.
- [82] H. H. Wasserman, C. M. Baldino, S. J. Coats, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 8231-8235.
- [83] H. H. Wasserman, D. S. Ennis, C. A. Blum, V. M. Rotello, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6003-6006.
- [84] W. Adam, Y. Chan, D. Chan, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 2800-2803.
- [85] R. Aldington, J. Baldwin, D. Catterick, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2000**, 299-302.
- [86] J. L. Martin, J. Begun, A. Schindeler, W. A. Wickramasinghe, D. Alewood, P. F. Alewood, D. A. Bergman, R. I. Brinkworth, G. Abbenante, D. R. March, R. C. Reid, D. P. Fairlie, *Biochemistry*, **1999**, *38*, 7978-7988.
- [87] H. Angliker, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4014-4018.
- [88] A. E. Smith, A. Helenius, *Science* **2004**, *304*, 237-242.
- [89] Wlodawer, Vondrasek, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1998**, *27*, 249-284.
- [90] M. O. Hengartner, *Nature* **2000**, *407*, 770-776.
- [91] D. W. Nicholson, *Nature* **2000**, *407*, 810-816.
- [92] M. Garcia, E. P. Peterson, B. Leiting, R. Ruel, D. Nicholson, N. Thornberry, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32608-32613.
- [93] B. H. Han, et al. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 30128-30136.
- [94] S. W. Kim, M. Chang, K. B. OH, *Biosci. Biotech. Biochem.* **2002**, *12*, 2751-2754.
- [95] S. W. Kim, D. S. Shin, M. N. OH, I. M. Chang, K. B. OH, *Biosci. Biotech. Biochem.* **2003**, *11*, 2477-2479.
- [96] S. K. Mazamian, G. Liu, E. R. Jensen, E. Lenoy, O. Schneewind, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 5510-5515.
- [97] S. W. Kim, I. M. Chang, K. B. OH, *Biosci. Biotech. Biochem.* **2002**, *12*, 2751-2754.
- [98] R. G. Kruger, S. Barkallah, B. A. Frankel, D. G. McCafferty, *Bioorg. Med. Chem* **2004**, *12(13)*, 3723-3729.
- [99] M. J. Genin, C. Biles, B. J. Kaiser, S. M. Poppe, S. M. Swaney, W. G. Tarpley, Y. Yagi, D. L. Romerom, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1034-1040.
- [100] W. T. Ashton, R. M. Sisco, H. Dong, K. A. Lyons, G. A. Doss, B. Leiting, R. A. Patel, J. K. Wu, F. Marsilio, N. A. Thornberry, A. E., Weber *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2253-2258.
- [101] H. A. De Wald, S. Lobestael, B. P. H. Poschel, *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 982-987.
- [102] H. Azami, D. Barrett, A. Tanaka, H. Sasaki, K. Matsuda, M. Sakurai, T. Terasawa, F. Shirai, T. Chiba, Y. Matsumoto, S. Tawara, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 961-982.
- [103] S. R. Schufer, C. J. Coletta, R. Tedesco, G. Nishiguchi, K. Carlson, J. Sun, B. S. Katzenellenbogen, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4934-4947; Y. R. Haug, J. A. Katzenellenbogen, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2833-2836; M.

- Begtrup, H. P. Nytoft, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1985**, *1*, 81-87; B. Clapham, J. Richards, M. Wood, A. Sutherland, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 9061-9064.
- [104] V. Nair, S. C. Mathew, A. T. Biju, E. Suresh, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2070-2073; T. Van Herck, et al., *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3945-3951; A.R. Katritzky, et al., *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6787; S. Schufer, et al., *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4934-4947.
- [105] D. Ferraris, B. Duvall, Y.-S. Ko, A. G. Thomas, C. Rojas, P. Majer, K. Hashimoto, T. Tsukamoto, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1231-1241.
- [106] Z. Ji, A. A. Ahmed, D. H. Albert, J. J. Bouska, P. F. Bousquet, A. Cunha, G. Diaz, K. B. Glaser, J. Guo, C. M. Harris, J. Li, P. A. Marcotte, M. D. Moskey, T. Oie, L. Pease, N. B. Soni, K. D. Stewart, S. K. Davidsen, M. R. Michaelides, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3357-3359.
- [107] A. Gopalsamy, M. Shi, J. Golas, E. Vogan, J. Jacob, M. Johnson, F. Lee, R. Nilakantan, R. Petersen, K. Svenson, R. Chopra, M. S. Tam, Y. Wen, J. Ellingboe, K. Arndt, F. Boschelli *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 373-375.
- [108] S. Kobayashi, R. Akiyama, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 9211-9214.
- [109] W. J. Haap, D. Kaiser, T. B. Walk, G. Jung, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3705-3724.
- [110] Ripka et al., *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 3593-3608.
- [111] R. M. Claramunt, D. Sanz, S. Aggarwal, A. Kumar, O. Parakash, S. P. Singh, J. Elguero, *Arkivoc*, **2006**, *xiv*, 35-45.
- [112] A. Marzinzik, E. R. Felder, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 723-727.
- [113] J. W. Skiles, J. T. Suh, B. E. Williams, P. R. Menard, J. N. Barton, B. Love, H. Jones, E. S. Neiss, A. Schwab, W. S. Mann, *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 784-796; H. Umemiya, H. Fukasawa, M. Ebisawa, L. Eyrolles, E. Kawachi, G. Eisenmann, H. Gronemeyer, Y. Hashimoto, K. Shudo, H. Kagechika, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 4222-4234; A. M. Venkatesan, Y. Gu, O. Dos Santos, T. Abe, A. Agarwal, Y. Yang, P. J. Petersen, W. J. Weiss, T. S. Mansour, M. Nukaga, A. M. Hujer, R. A. Bonomo, J. R. Knox, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6556-6568; C. Ma, H. Deng, Y. Zhang, M. Bian, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7957-7961.
- [114] R. Malli, M. Frieden, M. Trenker, W. F. Graier, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 12114-12122; N. Neamati, J. A. Turpin, H. E. Winslow, J. L. Christensen, K. Williamson, A. Orr, W. G. Rice, Y. Pommier, A. Garofalo, A. Brizzi, G. Campiani, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3334-3341; H. Maruenda, F. Johnson, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2145-2151.
- [115] M. K. Schwarz, D. Tumelty, M. A. Gallop, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2219-2231.
- [116] F. Micheli, F. Degiorgis, A. Feriani, A. Paio, A. Pozzan, P. Zarantonello, P. Senesi, *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 224-228.
- [117] A. Nefzi, N. A. Ong, M. QA. Giulianotti, J. M. Ostresh, R. A. Houghten, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4939-4942.
- [118] M. H. Bolli, S. V. Ley, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, *1*, **1998**, 2243-2246; K. Zeller et. al, *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 5151-5153; K. Zeller et. al, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2310-2318; *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, *1*, **1998**, 2243-2246.
- [119] W. Adam, L. Hadjirapoglou, A. Smerz, *Chem. Ber.* **1991**, *124*, 227-232.
- [120] K. Webb, S. J. Ruzskay, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 401-410.

- [121] K. Shikata, H. Niuro, H. Azuma, K. Ogino, T. Tachibana, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 2723-2728.
- [122] T. Kolter, K. Sandhoff, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1632-1670.
- [123] R. M. Devant, *Kontakte (Darmstadt)* **1992**, *3*, 11-28.
- [124] A. Gomez-Munoz, D. W. Waggoner, L. O'Brien, D. N. Brindley, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 26318-26325.
- [125] H. Azuma, S. Ijichi, A. Masuda, T. Izumi, T. Yoshimoto, T. Tachibana, *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 2860-2867.
- [126] M. Frigerio, M. Santagostina, S. Sputare, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4537-4538.
- [127] Ann M. Dougherty et al., *org. lett.* **2006**, *8*, *4*, 649-652.
- [128] A. G. Myers, B. Zhong, M. Movassaghi, D. W. Kung, B. A. Lanman, S. Kwon, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1359-1362.
- [129] J.-M. Lee, H.-S. Lim, S.-K. Chung., *Tetrahedron:Asymmetry* **2002**, *13*, 343-347.
- [130] S.-K. Chung et al., *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 1441-1444.
- [131] R. M. Ndonge, D. P. Izmirian, M. F. Dunn, K. O. Yu, S. A. Porcelli, A. Khurana, M. Kronenberg, S. K. Richardson, A. R. Howell, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10260-10270.
- [132] S. Weik T. Luksch, A. Evers, J. Böttcher, A. Hasilik, H.-G. Löffler, G. Klebe, J. Rademann., *ChemMedChem* **2006**, *1*, 445-457.
- [133] T. Yamamoto, H. Hasigawa, T. Hakogi, S. Katsumura, *Org. Lett.* **2006**, *8*, *24*, 5569-5572.
- [134] R. C. So, R. Ndonge, D. Izmirian, S. K. Richardson, A. R. Howell, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, *9*, 3233.
- [135] B. Gentil, F. Grimot, C. Riva, *Mol. Cell. Biochem.* **2003**, *254*, 203-210.
- [136] A. S. Arora, B. J. Jones, T. C. Patel, S. F. Bronk, G. J. Gores, *Hepathology* **1997**, *25*, 958-963.
- [137] P.J. Hartfield, G. C. Mayne, A. W. Murray, *FEBS Lett.* **1997**, *401*, 148-152.
- [138] A. Batistatou, L. A. Green, *J. Cell. Biol.* **1993**, *122*, 523-532.
- [139] H. Gloeckner, T. Jonuleit, H.-D. Lemke, *JIM* **2001**, *252*, 131-138.
- [140] G. R. Nakayama, M. C. Caton, M. P. Nova, Z. Parandoosh, *JIM* **1997**, *204*, 205-208.
- [141] I. Van Overmeire, S. A. Boldin, K. Venkataraman, R. Zisling, S. D. Jonghe, S. Van Calenbergh, D. Keikeleire, A. H. Futerman, P. Herdewijen, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4189-4199.
- [142] S. E. Wolkenberg, D. D. Wisnoski, W. H. Leister, Y. Wang, Z. Zhao, C. W. Lindsley, *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 1453-1456.
- [143] I. L. Finar, B. H. Walter, *J. Chem. Soc.* **1960**, 1588-93.
- [144] H. J. Bestmann, H. Schulz, *Chem. Ber.* **1962**, 2921; H. J. Bestmann G. Graf, H. Hartung, *Liebigs Ann, Chem* **1967**, *706*, 68-74; H. J. Bestmann et al., *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, *27*, 4765; R. A. Aitken et al., *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 840; D. Weiyu et al., *J. Chem Soc. Perkin Trans., 1*, **1993**, 855.
- [145] S. Kim, N. Lee, S. Lee, T. Lee, Y. M. Lee, *J. Org. Chem.* **2007**, *73*, 1379-1385.
- [146] J. Liao, J. Tao, G. Lin, D. Liu, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4715-4733.
- [147] A. R. Howell, R. C. So, S. K. Richardson, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11327-11347.
- [148] A. R. Howell, A. J. Ndakala, *J. Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 365-391.
- [149] H Yang, H. Lee, R. Wüttenberg, M. Egi, W. Huang, L. S. Liebeskind, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1132-1140.

-
- [150] Y.-Q. Wu, D. E. Wilkinson, D. Limburg, J.-H. Li, H. Sauer, D. Rous, S. Liang, D. Spicer, M. Fuller, H. Guo, P. Howorth, R. Sony, Y. Chen, G. S. Hamilton, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3558-3568.
- [151] R. Tripathi, M. A. Ator, J. P. Mallamo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2315-2319.
- [152] B. M. Wagner, R. A. Smith, P. J. Coles, L. J. Copp, M. J. Ernest, A. Krantz, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1833-1840.
- [153] R. Calabretta, C. Giordano, C. Gallina, V. Morea, V. Con salvi, R. Scandurra, *Eur. J. Med. Chem.* **1995**, *30*, 931-941.
- [154] R. W. Marquis et al., *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 581-588.
- [155] R. W. Marquis, et al., *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 581-588; V. J. Hruby et al., *Pept. Sci.* **1997**, *43*, 219-266; P. S. Dragovic, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 45-48; J. Gante, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1780-1802.
- [156] V. N. Listvan, A. P. Stasyuk, *Zhurnal Organicheskoi Khimii* **1983**, *21*, 392-398.
- [157] C. Baldoldi, E. Licandro, S. Maiorana, E. Menta, A. Papagni, *Synthesis* **1987**, 288-291.
- [158] A. S. Antonyuk, A. V. Dembrovskii, *Zhurnal obshchei Khimii* **1982**, *53*, 1746-1751.
- [159] N. S. Isaacs, O. H. Abed, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 1209-1210.
- [160] M. P. Cooke, D. L. Burman, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 4955-4963.
- [161] G. Sorg, A. Mebgel, G. Jung, J. Rademann, *Angew. Chem.* **2001**, *40*, 4395.
- [162] M. P. Cooke, D. L. Burman, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 4955-4963.
- [163] M. Gouterman, C. R. Connell, P. Sayer, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 642-644.